



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP



**Atividade *in vitro* de óleos essenciais contra
Neoechynorhynchus buttnerae de tambaqui e seus
efeitos no hospedeiro**

Discente: Rodrigo Eduardo Goulart Salaro

Orientadora: Prof. Dra. Fabiana Pilarski

Jaboticabal – São Paulo

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP

**Atividade *in vitro* de óleos essenciais contra
Neoechynorhynchus buttnerae de tambaqui e seus
efeitos no hospedeiro**

Discente: Rodrigo Eduardo Goulart Salaro

Orientadora: Prof. Dra. Fabiana Pilarski

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da Unesp, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Jaboticabal – São Paulo

2018

S159a Salaro, Rodrigo Eduardo Goulart
Atividade *in vitro* de óleos essenciais contra *Neoechynorhynchus buttnerae* de tabaqui e seus efeitos no hospedeiro / Rodrigo Eduardo Goulart Salaro. -- Jaboticabal, 2018
x, 65p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Centro de Aquicultura da Unesp, 2018
Orientadora: Fabiana Pilarski
Banca examinadora: Estevam Guilherme Lux Hoppe, Ricardo
Massato Takemoto.
Bibliografia

1. *Neoechynorhynchus buttnerae*. 2. Fitoterápico. 3. Eficácia. 4.
Aquicultura 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 –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

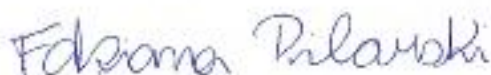
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Atividade in vitro de óleos essenciais contra neoechinorhynchus buttnerae de tambaqui e seus efeitos no hospedeiro

AUTOR: RODRIGO EDUARDO GOULART SALARO

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. FABIANA PILARSKI

Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / Centro de Aquicultura - CAUNESP



Prof. Dr. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP / Jaboticabal



Professor Assistente Doutor RICARDO MASSATO TAKEMOTO

NUPÉLIA - Laboratório Ictioparasitologia / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Jaboticabal, 06 de junho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, que sempre me incentivaram nos estudos.

À minha esposa e meus enteados, pela compreensão pelos dias e horas que estive ausente me dedicando a este trabalho.

À Dra. Fabiana Pilarski, minha orientadora, pela confiança em mim depositada, pela ajuda e atenção dispensada durante esse período.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos, do Centro de Aquicultura da UNESP, Lindomar, Inácio, Raphael, Suzana, Fernando, Gustavo, Silvia e Thiago, que não só me ajudaram na execução deste trabalho, como foram minha família na cidade de Jaboticabal.

Ao Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, por me conceder afastamento de minhas funções como docentes na instituição a fim de aprimorar meus conhecimentos.

A toda a equipe da ETEC Orlando Quagliato, em especial a direção por fazer tudo o que estivesse ao seu alcance para que eu pudesse cursar o Mestrado.

À Trouw Nutrition por viabilizar os custos com o transporte dos peixes de Rondônia até Jaboticabal, o que permitiu a realização deste estudo.

Ao piscicultor Édson Sápiras, de Ariquemes, RO, pela doação dos peixes, sem os quais não seria possível a realização deste experimento.

ÍNDICE

Índice de figuras	i
Índice de tabelas	ii
Resumo	8
Abstract	9
1 Introdução.....	10
2 Revisão de Literatura	12
2.1 A criação de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	12
2.2 Doenças parasitárias do tambaqui e seus híbridos	14
2.3 Parasitismo por acantocéfalo	17
2.4 Fitoterápicos no tratamento de doenças em peixes	20
2.4.1 Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	21
2.4.2 Alho (<i>Allium sativum</i>)	22
2.4.3 Melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	23
2.4.4 Manjerição (<i>Ocimum basilicum</i>)	24
2.4.5 Hortelã pimenta (<i>Mentha piperita</i>)	24
3 Objetivos	29
3.1 Objetivos gerais	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 Materiais e métodos	29
4.1 Peixes	29
4.2 Coleta dos parasitos	30
4.3 Identificação dos parasitos	31
4.4 Óleos essenciais	31
4.5 Ensaio <i>in vitro</i>	32

4.6 Ensaio <i>in vivo</i>	33
4.6.1 Desenho experimental.....	33
4.6.2 Colheita sanguínea.....	34
4.6.3 Análises hematológicas.....	34
5 Análise estatística	35
5.1 Ensaio <i>in vitro</i>	35
5.2 Ensaio <i>in vivo</i>	35
6 Resultados.....	36
6.1 Análise dos óleos essenciais	36
6.2 Identificação dos parasitos	39
6.3 Índices parasitários	40
6.4 Ensaio <i>in vitro</i>	40
6.5 Ensaio <i>in vivo</i>	44
7 Discussão.....	46
8 Referências	52

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Neoechynorhynchus buttnerae</i>	18
Figura 2: Microfotografia de <i>Neoechynorhynchus buttnerae</i> evidenciando a probóscide provida de ganchos grandes, médios e pequenos	39
Figura 3: Microfotografia da região posterior de <i>Neoechynorhynchus buttnerae</i> mostrando posição do poro genital subterminal na fêmea e terminal no macho	40
Figura 4: Sobrevivência média dos acantocéfalos expostos aos O.E.s de <i>A. sativum</i> , <i>M. alternifolia</i> , <i>M. piperita</i> , <i>O. basilicum</i> e <i>T. vulgaris</i> , contra <i>N. buttnerae</i> na concentração de 50mg/L	41
Figura 5: Sobrevivência média dos acantocéfalos expostos aos O.E.s de <i>A. sativum</i> , <i>M. alternifolia</i> , <i>M. piperita</i> , <i>O. basilicum</i> e <i>T. vulgaris</i> , contra <i>N. buttnerae</i> na concentração de 100mg/L	42
Figura 6: Sobrevivência média dos acantocéfalos expostos aos O.E.s de <i>A. sativum</i> , <i>M. alternifolia</i> , <i>M. piperita</i> , <i>O. basilicum</i> e <i>T. vulgaris</i> , contra <i>N. buttnerae</i> na concentração de 200mg/L	43
Figura 7: Sobrevivência média dos acantocéfalos expostos aos O.E.s de <i>A. sativum</i> , <i>M. alternifolia</i> , <i>M. piperita</i> , <i>O. basilicum</i> e <i>T. vulgaris</i> , contra <i>N. buttnerae</i> na concentração de 400mg/L	43

Índice de Tabelas

Tabela 1. Fitoterápicos no controle de patógenos de peixes.....	26
Tabela 2. Composição centesimal dos óleos essenciais de <i>A. sativum</i> , <i>O. basilicum</i> , <i>M. alternifolia</i> , <i>M. piperita</i> e <i>T. vulgaris</i>	37
Tabela 3. Parâmetros hematológicos de tambaqui alimentado com diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho (<i>T. vulgaris</i>) durante 15 dias.....	44
Tabela 4. Parâmetros bioquímicos de tambaqui alimentado com dieta contendo diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho (<i>T. vulgaris</i>) durante 15 dias.	45

RESUMO

O tambaqui é uma espécie nativa do Brasil, cuja criação tem se intensificado nos últimos anos, especialmente na região norte do país. Juntamente com essa intensificação, as parasitoses vêm crescendo, sendo *Neoechynorhynchus buttnerae* um endoparasita que tem impactado fortemente a atividade. Substâncias registradas para outras finalidades e espécies têm sido amplamente utilizadas na tentativa de controlar o problema, com consequências potencialmente negativas para o meio ambiente, à saúde humana e animal. Neste contexto, o uso de fitoterápicos representa um recurso no controle da parasitose por *N. buttnerae*. Assim, este trabalho avaliou a eficácia antiparasitária *in vitro* dos óleos essenciais (OE) de *Mentha piperita*, *Melaleuca alternifolia*, *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris* e *Allium sativum* contra *N. buttnerae* de tambaqui. As concentrações testadas para cada óleo foram 50mg/L, 100mg/L, 200mg/L e 400mg/L, e a morte dos parasitos avaliada a cada 15 minutos durante duas horas. Adicionalmente, analisou-se o efeito da inclusão de OE de *T. vulgaris* à ração, nos níveis de 1%, 2%, e 3%, durante 15 dias, sobre a saúde dos peixes. Os resultados demonstraram que o *T. Vulgaris* foi o mais eficaz contra acantocéfalos entre os compostos testados, e não provocou alterações hematológicas ou bioquímicas nos peixes. Assim, o OE de *Thymus vulgaris* pode ser considerado promissor na prevenção e no tratamento de acantocéfalos em tambaqui.

Palavras chave: *Colossoma macropomum*, Acanthocephala, fitoterápico, anti-helmíntico, aquicultura

ABSTRACT

Tambaqui is a native Brazilian specie that the production has intensified in years, especially in the north region. Along with this intensification, the parasitosis have been growing, being *Neoechynorhynchus buttnerae*, an endoparasite that has strongly impacted the activity. Substances registered for other purposes and species have been widely used, with potentially negative consequences for the environment, human, and animal health. In this context, the use of phytotherapics represents a resource in the control of *N. buttnerae* parasitosis. This work evaluated the in vitro antiparasitic efficacy of essential oils (EO) of *Mentha piperita*, *Melaleuca alternifolia*, *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris* and *Allium sativum* against *N. buttnerae* in tambaqui. The concentrations tested of each oil were 50mg/L, 100mg/L, 200mg/L and 400mg/L, and the parasite death was evaluated every 15 minutes for two hours. Additionally, the effect of inclusion of *T. vulgaris* EO on the diet at 1%, 2%, and 3% for 15 days on fish health was analyzed. The results showed that *T. vulgaris* was the most effective against acanthocephans among the tested compounds and did not cause hematological or biochemical changes in fish. Thus, *Thymus vulgaris* OE may be considered promising in the prevention and the treatment against acanthocephalosis in tambaqui

Keywords: *Colossoma macropomum*, Acanthocephala, phytotherapics, antihelmintic, aquaculture.

1. INTRODUÇÃO

A pesca e a aquicultura constituem uma importante fonte de alimentos para milhões de pessoas no mundo. O suprimento de pescado alcançou o recorde de 20kg por habitante no ano de 2014, devido ao crescimento da aquicultura mundial (FAO, 2016).

Em 2016, a produção aquícola brasileira gerou uma receita de R\$ 3,26 bilhões, um crescimento de 4,94% em volume e 1,88% em valor, quando comparado a 2015, referente à produção de 507.122.920 toneladas de peixes. A produção de tilápia é responsável por quase metade desse montante (239.090.927 toneladas), seguida do tambaqui, a espécie nativa mais produzida no Brasil, com produção de 136.991.478 toneladas (27%), seguida pelos híbridos tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) e tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*), com produção de 44.948,272 mil toneladas (8,9%) (IBGE, 2016).

Com a intensificação da produção e falhas no manejo produtivo, o número de doenças, principalmente de origem parasitária que acometem o tambaqui cresceu consideravelmente, causando prejuízos e entraves na cadeia produtiva.

Dentre os parasitos que acometem o tambaqui, os protozoários, crustáceos e helmintos estão entre os mais importantes. Os acantocéfalos, endoparasitos com ciclo de vida complexo, vem merecendo destaque recentemente, ocasionado grandes perdas na produção de tambaqui na região norte do Brasil (Amazonas, Rondônia e Amapá) (MACIEL et al., 2009; SILVA et al., 2013; DIAS et al., 2015).

Embora tenha se considerado que a ocorrência do parasitismo por acantocéfalos frequentemente não provoque alterações graves em seus

hospedeiros, em condições de criação, as infestações podem ser altas e os danos severos, podendo inclusive levar o hospedeiro à morte (PAVANELLI et al., 2013).

Até o momento, sabe-se que apenas uma espécie de acantocéfalo parasita o tambaqui, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, considerado um parasita emergente na piscicultura brasileira (MALTA et al., 2001; JERÔNIMO et al., 2017). Os peixes parasitados apresentam intensa inflamação intestinal devido à fixação do parasito ou em elevada quantidade, apresentam oclusão parcial ou total do trato intestinal, prejudicando a capacidade de absorção do alimento, tendo como resultado a redução do desempenho produtivo (MALTA et al., 2001; JERÔNIMO et al., 2017).

O crescimento da piscicultura no Brasil tem levado ao aumento na ocorrência de doenças e do uso de quimioterápicos e antimicrobianos para seu controle. Tal prática é questionada devido ao seu impacto negativo nos peixes e no ambiente, como acúmulo de resíduos, imunossupressão, seleção de microrganismos resistentes e prejuízo à comercialização (BILLER-TAKAHASHI, 2014; PILARSKI et al., 2017). Uma alternativa para o controle de doenças na piscicultura são os óleos essenciais de plantas, fitoterápicos que apresentam extensa atividade antimicrobiana e antiparasitária em seus componentes (LANG & BUCHBAUER, 2012).

Até o momento, literatura sobre o tratamento ou controle desta doença nos sistemas de produção é escassa. Tendo em vista a importância econômica da produção de tambaqui e seus híbridos no país, especialmente na região norte, e o impacto econômico atribuído à infecção por *N. buttnerae*, assim como, o efeito negativo do uso de quimioterápicos no tratamento de doenças de organismos aquáticos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antiparasitário *in vitro* dos

óleos essenciais de alho (*Allium sativum*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), Manjeriço (*Ocimum basilicum*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), e conseqüentemente, seu potencial para aplicação em ensaios de eficácia *in vivo* em juvenis de tambaqui.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A criação de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Os chamados “peixes redondos” recebem esta denominação popular em virtude do formato arredondado de seus corpos. O tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) e seus híbridos são representantes deste grupo que apresentam características favoráveis à criação (MORO et al., 2013).

O tambaqui pertence à ordem dos Characiformes e à família Serrasalmidæ (GERY, 1977). Nativo dos rios Amazonas, Orinoco e seus afluentes, chega ao comprimento máximo de 100cm e peso superior a 30kg, atingindo maturidade sexual entre o 4º e 5º ano de vida. Na piscicultura, esta espécie atinge a maturação sexual em até três anos (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998; ARAÚJO-LIMA & GOMES 2005).

É uma espécie onívora, com capacidade para assimilar proteínas e energia provenientes de diferentes fontes e esta plasticidade é uma adaptação à sazonalidade de oferta de alimentos na bacia amazônica, onde esses animais se alimentam principalmente de frutos e sementes no período chuvoso e de zooplâncton no período de seca (OLIVEIRA et al., 2006).

O tambaqui é a segunda espécie mais produzida no Brasil, com 136.992 toneladas em 2016, com aumento de 0,84% em relação a 2015, sendo a primeira

entre as nativas, tendo representado 27% do total de peixes produzidos no país em 2016, com destaque para a região Norte, especialmente o estado de Rondônia. (IBGE, 2015; IBGE, 2016). É uma espécie que apresenta bom desempenho produtivo nos sistemas de criação, devido a sua rusticidade, fácil aceitação de ração, assim como a disponibilidade de alevinos o ano todo (VALLADÃO et al., 2016), bem como, bom potencial de crescimento, alta produtividade e resistência à baixos níveis de oxigênio dissolvido (MELO et al., 2001; ARAÚJO-LIMA & GOMES, 2005).

Em condições de baixa concentração de oxigênio dissolvido, ou seja, com limite inferior a 0,5mg O₂/L, o tambaqui desenvolve o lábio inferior em até duas horas, cuja função é direcionar a camada superficial da água mais oxigenada para a região das brânquias. Quando a concentração de oxigênio retorna aos seus níveis normais no ambiente, o lábio desaparece no mesmo intervalo de tempo (ALMEIDA-VAL & VAL, 1995).

Todavia, com a intensificação da criação desta espécie, principalmente em tanques-rede na fase de alevinagem e engorda, a ocorrência de doenças parasitárias e bacterianas tem aumentado resultando em perda parcial ou total da produção (VALLADÃO et al., 2016). O impacto econômico relacionado às doenças na criação de peixes no Brasil é de 25.026,3 toneladas, correspondendo a 5,05 milhões de dólares (TAVARES-DIAS & MARTINS, 2017).

Pacotes tecnológicos relacionados ao manejo, nutrição, fisiologia e tecnologia pós-colheita para esta espécie já estão bem desenvolvidos, todavia, o controle de doenças, especialmente causada por parasitos, como os acantocéfalos ainda são um entrave para a produção em larga escala desta importante espécie nativa para a piscicultura brasileira (CHAGAS et al., 2009).

2.2 Doenças parasitárias do tabaqui e seus híbridos

Os fatores predisponentes para uma infestação parasitária são a qualidade da água inadequada, principalmente com elevada quantidade de matéria orgânica, a elevada densidade de estocagem, a falta de prevenção e biossegurança (VALLADÃO et al., 2016).

Já foram descritas a ocorrência de pelo menos 25 espécies de parasitas em tabaqui (EIRAS et al., 2010) e as mais comuns são causadas por monogenóides, acantocéfalos, *Myxobolus sp.*, copépodos e branquiúros (MALTA et al., 2001).

Perulernaea gamitanae Tatcher & Paredes, 1985, é um copépoda que ocorre em tabaquis em ambiente natural (FISCHER et al., 2003), porém, em ambiente de criação, vem ocorrendo em maior prevalência, ganhando importância econômica por causar mortalidade expressiva e à depreciação do produto final em diversas pisciculturas da região norte do Brasil (TAVARES-DIAS et al., 2011) e na Amazônia peruana (DELGADO et al., 2011). As fêmeas adultas parasitam a cavidade opercular, oral e narinas dos peixes, causando inflamação local, anemia e redução da resistência a outros patógenos (TAVARES-DIAS et al., 2011; PAVANELLI et al., 2013).

Também são relatados com frequência os branquiúros, sendo o tabaqui suscetível a *Argulus chimendesi* Malta & Varella, 2000, *Argulus multicolor* Stekhoven, 1937, e *Dolops carvalho*, Castro, 1949 (MALTA et al., 1984, EIRAS et al. 2010). Esses parasitas podem permanecer por longos períodos livres na coluna d'água, e, quando na superfície do hospedeiro, perfuram o tegumento, injetando enzimas digestivas e anticoagulantes, alimentando-se de sangue e

tecidos dos hospedeiros. Esta ação, por sua vez, pode causar ulcerações e predispor os peixes a infecções secundárias (GOMES et al., 2013; PAVANELLI et al., 2013).

De acordo com Godoi et al. (2012), os monogenéticos são os parasitos mais encontrados em tambaquis criados na região norte do Brasil. Este grupo costuma apresentar especificidade parasitária, sendo associados ao tambaqui as espécies *Anacanthorus penilabiatatus* Boeger, Husak, Martins, 1995, *Anacanthorus spathulatus* Kritsky, Thatcher & Kayton, 1979, *Linguadactyloides brinkmanni* Thatcher & Kritsky, 1983, *Mimarothecium boegeri* Cohen & Kohn, 2005, *Nothozothecium euzeti* Kritsky, Boeger & Jégu, 1996, e *Notozothecium janauachensis* Belmont-Jégu, Domingues & Martins, 2004 (EIRAS et al., 2010). Possuem ciclo de vida direto e proliferação rápida, e por isso, são motivo de preocupação em todas as fases de criação (PEREIRA et al., 2016). Os parasitos se fixam através de ganchos aos filamentos branquiais, alimentando-se de tecidos do hospedeiro, causando hiperplasia celular e hipersecreção de muco, levando a complicações respiratórias (PAVANELLI et al., 2013).

O protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876, é um dos parasitos mais comuns no tambaqui, possui baixa especificidade parasitária, e é o causador da ictiofitiríase, conhecida popularmente como doença dos pontos brancos quando invade a epiderme do hospedeiro (BUCHMANN et al., 2001). As lesões provocadas pelo protozoário favorecem a ocorrência de infecções secundárias (VALLADÃO et al., 2016). O ciclo de vida deste parasito pode ser dividido em fases de vida livre e uma fase parasitária (MATTHEWS, 2005). Na proliferação deste parasito, as brânquias assumem grande importância. O

desenvolvimento de trofontes no epitélio branquial é o responsável pelo grande número de mortes nos peixes durante a infecção (PILARSKI et al., 2016).

Infecções pelos mixosporídeos *Henneguya piaractus* Martins e Souza, 1997 e *Myxobolus colossomatis* (Molnar & Békési, 1993) afetam as brânquias e os rins de tambaquis, comprometendo a função destes órgãos (MARTINS et al., 1999). A presença massiva de *H. piaractus* nas brânquias pode provocar fusão de lamelas, reduzindo a capacidade de troca gasosa deste órgão e levando o peixe a morte por asfixia (ADRIANO et al., 2005).

Nos híbridos tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) e tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomum*) foram descritas a ocorrência de *Ichthyophthirius multifiliis*, *Piscinoodinium pillulare* (Schäperclaus, 1954), *Anachanthorus spatulatus*, *Notozothecium janauachensis*, *Mymarothecium viatorum* Boeger, Piasecki & Sobecka, 2002, *Neoechinorhynchus buttnerae*, *Cucullanus colossoma* Ungría-Díaz, 1968, *Perulernaea gamitanae*, *Linguadactyloides brinkmanni*, *Mymarothecium boegeri*, *Procamallanus (Spirocamallanus) inopinatus* Travassos, Artigas & Pereira, 1928 (SILVA et al., 2013; DIAS et al., 2015).

No Brasil, há uma carência de produtos registrados para o controle das parasitoses nas pisciculturas. Assim, com frequência, são utilizados produtos registrados para outras finalidades ou espécies, incluindo desinfetantes, corantes e agrotóxicos. Relatos de piscicultores têm demonstrado que comumente são utilizados no controle de parasitos o sal comum, cal, formaldeído, verde de malaquita, sulfato de cobre, azul de metileno, diflubenzuron, paration metílico, triflumuron e triclorfon (LUVISOTO-SANTOS et al., 2009), muitos altamente

tóxicos, contaminantes do meio aquático e que deixam resíduos na carne do pescado, comprometendo a qualidade do produto final.

2.3 Parasitismo por acantocéfalos

O filo Acanthocephala atualmente possui cerca de 1300 espécies descritas, distribuídas em quatro classes, 26 famílias e 157 gêneros (AMIN, 2013).

São considerados endohelmintos, endoparasitos obrigatórios, cilíndricos, desprovidos de aparelho digestivo. Na extremidade anterior apresentam uma probóscide, onde se encontram espinhos, os quais também são usados para a fixação do parasito, e na posterior, uma abertura genital (PAVANELLI, 2013).

Santos et al. (2008) listaram 23 gêneros de acantocéfalos, compreendendo 34 espécies determinadas e 13 não determinadas reportadas em peixes marinhos, continentais e estuarinos. No Brasil, se tem conhecimento de apenas uma espécie parasitando tambaquis, *Neoechynorhynchus buttnerae*.

Os acantocéfalos são parasitos com ciclo de vida indireto, necessitando de um artrópode como hospedeiro intermediário e um vertebrado como hospedeiro definitivo, contudo, hospedeiros paratênicos podem estar presentes (CHAGAS et al., 2015; EIRAS et al., 2010).

Neoechynorhynchus buttnerae adulto, libera seus ovos no interior do intestino do tambaqui. Os ovos contendo a larva chamada de acântor em seu interior são liberados no ambiente e então ingeridos por um crustáceo ostracoda, onde o parasito passa por todas as fases larvais, de acantela até cistacanto, esta última a forma infectante, que, ao ser ingerida pelo tambaqui, libera o juvenil no intestino do peixe, fechando o ciclo (LOURENÇO, 2017).

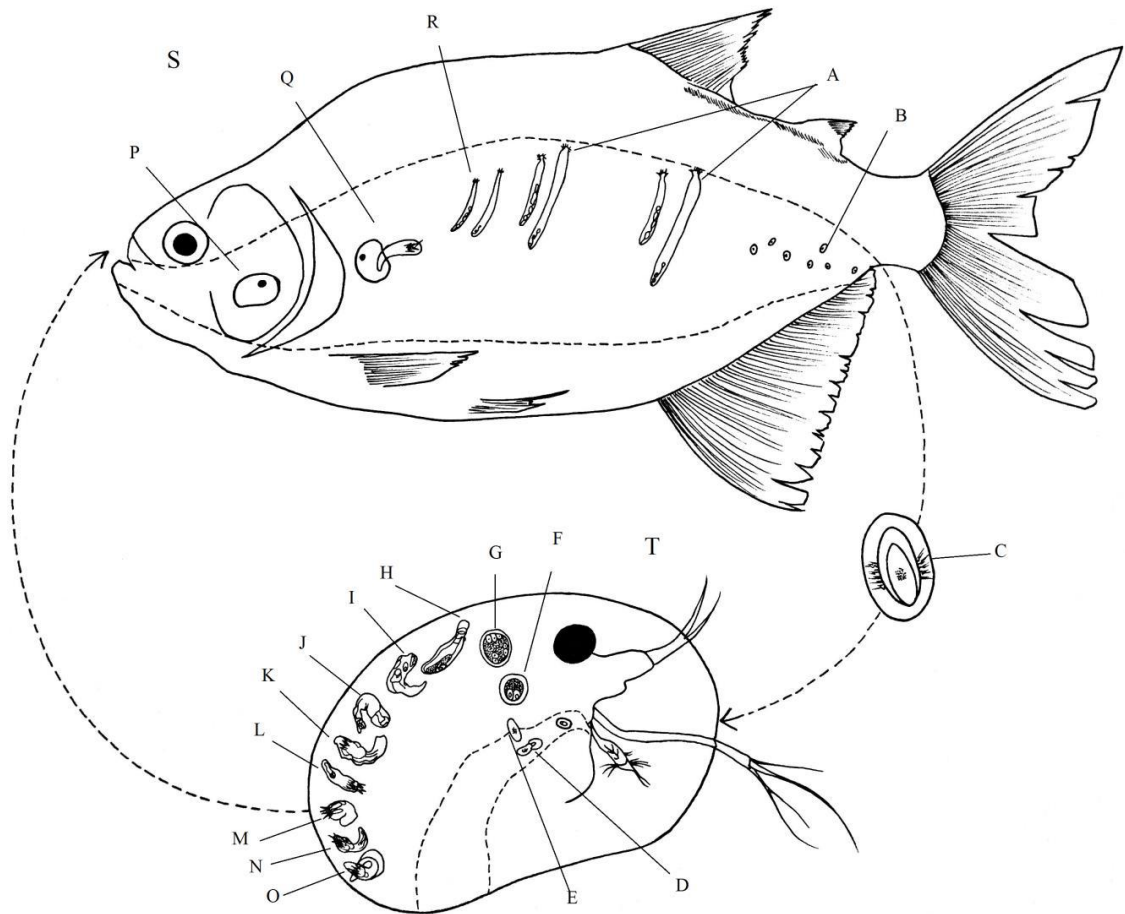


Figura 1. Ciclo de vida de *N. buttnerae* A: Parasitos adultos no intestino do tambaqui. B e C: Ovos contendo a larva acântor liberados no intestino do tambaqui e na água. D e E: Larva acântor saindo do ovo no intestino do crustáceo ostracoda, F, G, H, I, J, L M: Acantela em diferentes fases de desenvolvimento fora do ovo 2a9. N: Fase juvenil. O: Fase infectante (cistacanto). P: Ostracoda dentro do tambaqui. Q e R: Juvenil de *N. buttnerae* sendo liberado no intestino do tambaqui (LOURENÇO, 2017).

Os acantocéfalos, de acordo com alguns autores, eram considerados parasitos que raramente causavam alterações significativas ou mortalidade (EIRAS et al., 2010). Todavia, com a intensificação da produção de tambaquis na região norte do Brasil, o parasito se tornou emergente, causando severas alterações patológicas no hospedeiro, redução do crescimento e ganho de peso e gastos elevados com a alimentação dos peixes (JERÔNIMO et al., 2017; SILVA-GOMES et al., 2017).

Fischer et al. (2003) estudaram a fauna parasitária de populações selvagens de tambaqui, coletados em novembro de 1995, no médio Rio Solimões, próximo aos municípios de Tefé e Coari, no Estado do Amazonas, e no baixo Rio Amazonas, no município de Santarém, Estado do Pará. Estes autores relataram a prevalência de 78% e 55,3% de *N. buttnerae*, com intensidade média de 98,4, e 16,6, nos tambaquis coletados no Médio Solimões e no Baixo Amazonas, respectivamente. Entretanto, em sistemas de criação, Malta et al. (2001) relataram prevalência de 100%, com intensidade média de 125,26, ocasionando crescimento lento, anorexia e mortalidade nos peixes parasitados. Diversas ocorrências têm sido relatadas em pisciculturas, sempre com 100% de prevalência e intensidade variando de 152 a 476,8 do parasito (JERÔNIMO et al., 2017; MATOS et al., 2017; SILVA-GOMES et al., 2017).

As principais lesões provocadas por esse parasito decorrem da penetração da probóscide no intestino, que pode alcançar diferentes profundidades, desde a mucosa até a camada muscular, causando dilaceração dos tecidos. Tal ação desencadeia uma forte resposta inflamatória, composta principalmente por macrófagos, células de Langherans e linfócitos, com ocorrência de granulomas em alguns animais e encurtamento das vilosidades nos peixes altamente parasitados (DIAS et al., 2015; JERÔNIMO et. al., 2017; SILVA-GOMES et al., 2017).

De acordo com Matos et al. (2017), quando livres no intestino, o metassoma volumoso do parasito causa descamação do ápice e compressão das vilosidades e abrasão do epitélio, enquanto a penetração da probóscide na parede do órgão ocorre mais raramente, nunca chegando à perfuração completa.

Essas alterações no intestino comprometem a capacidade de absorção de nutrientes, resultando em baixo desempenho produtivo.

Outras alterações observadas nos peixes parasitados por acantocéfalos são as hematológicas, com maior quantidade de trombócitos e monócitos em curimatás (*Prochilodus lineatus*) parasitados por *Neoechinorhynchus curemai* (BELO et al., 2013).

O controle desta parasitose no Brasil é realizado pelo uso dos benzimidazóis, levamisol, praziquantel e organofosforados, os quais são utilizados de forma indiscriminada e muitas vezes de forma preventiva, sem diagnóstico correto da doença. A utilização dessas substâncias na piscicultura pode contaminar o ambiente, contribuir para o aparecimento de organismos resistentes e provocar impactos adversos em espécies não-alvo, colocando em risco toda a cadeia trófica e também a saúde dos humanos, pela quantidade de resíduos presentes na carne do pescado (PILARSKI et al., 2017).

Até o momento, não há tratamento eficaz desta parasitose para aplicação em larga escala no Brasil, portanto, sua ocorrência pode resultar em severas perdas econômicas na piscicultura (CHAGAS et al., 2015).

Dentre as medidas de controle ecologicamente mais sustentáveis, destacam-se os fitoterápicos, os quais apresentam grande potencial como alternativa no tratamento de parasitoses em peixes (EL-GALIL & ABOELHADID, 2012).

2.4 Fitoterápicos no tratamento de doenças em peixes

Diversos fitoterápicos vêm sendo estudados como alternativa para o tratamento dos mais diversos patógenos de peixes, por possuírem compostos

biologicamente ativos e até o momento, serem considerados seguros para os peixes, ambiente e humanos. Resultados promissores têm sido descritos por vários autores e contra diferentes patógenos de peixes (VALLADÃO et al., 2015; VALLADÃO et al., 2016; MAJOLO et al., 2017; CUSTÓDIO-COSTA et al., 2017). Pesquisas recentes avaliando a eficácia de fitoterápicos contra patógenos de peixes encontram-se resumidas na tabela 1.

2.4.1 Tomilho (*Thymus vulgaris*)

O óleo essencial (OE) de tomilho possui como principal componente o timol, um potente antisséptico tanto para uso interno como externo. Seu uso na medicina humana é aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration), sendo aplicado no tratamento de indigestão, controle da febre, como anestésico e antisséptico (AZAD, et al., 2014). Também podem ser encontrados no OE de tomilho, terpenos, carvacrol e outros compostos, como linalol, limoneno, mirceno, cimeno, em menores porcentagens. A composição exata do óleo pode variar em função de fatores ambientais, genéticos, nutricionais da planta, assim como época da colheita (ÖZCAN & CHALCHAT, 2004).

O tomilho também vem sendo empregado em estudos sobre o controle e o tratamento de patógenos em peixes. O extrato metanólico desta planta apresentou efeito inibitório *in vitro* contra o nematóide *Procamallanus* spp. e o cestóide *Wenyonia* spp. parasitas de *Clarias gariepinus* e *Parachanna obscura* (AKINSANYA, 2016). Com relação às doenças bacterianas, o *T. vulgaris* apresentou bons resultados contra *Streptococcus iniae* (YLMAZ et al., 2013) e *Yersinia ruckeri* (GULEC et al., 2013).

Em estudo realizado *in vitro*, o *T. vulgaris* mostrou forte atividade contra as bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* e *Edwardsiella tarda*, indicando que pode ser capaz de modular a microbiota dos peixes se adicionado na ração. Já em estudo *in vivo*, realizado em tilápia-do-Nilo, a suplementação alimentar com 0.1, 0.5 e 1% durante 15 dias mostrou que o óleo foi capaz de estimular os componentes celulares da resposta imune não específica (nas maiores doses) sem causar efeitos deletérios à saúde e sem alterar a população de bactérias benéficas do intestino da tilápia (VALLADÃO, 2018).

Devido a suas propriedades antibacterianas e antiparasitárias sua aplicação também tem sido estudada como uma alternativa na conservação e no controle de patógenos veiculados por alimentos, mostrando-se eficaz contra larvas de *Anisakis*, em concentrações de 0,1% (GIARRATANA et al., 2014). Hernández et al. (2015) utilizaram diferentes níveis de inclusão de óleo essencial de *T. zygis* na ração de *Sparus aurata* por 12 semanas antes do abate dos animais e verificaram melhora nos atributos visuais e olfatórios da carne, e menores contagens de enterobactérias na dose de 2000mg/kg após 21 dias de estocagem do produto final.

2.4.2 Alho (*Allium sativum*)

Pesquisas recentes confirmaram o potencial terapêutico do alho, inclusive seu efeito antiparasitário (ROSNY et al., 2016). Na aquicultura, o alho tem se mostrado promissor como promotor do crescimento, imunostimulante e no controle de patógenos (LEE & GAO, 2012).

Produtos utilizando *A. sativum* já foram testados no controle de uma grande variedade de patógenos de peixes, apresentando eficácia diante de vários deles. O extrato de *A. sativum* foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* de *Spironucleus vortens*, um importante patógeno de ciclídeos (PUK & GUZ, 2014), reduzir a sobrevivência de *Procamallanus* spp. e *Wenyonia* spp, helmintos nematóides e cestóides parasitos de peixes (AKINSANYA, 2016). Já em estudos *in vivo*, banhos terapêuticos utilizando extrato de *A. sativum* foram capazes de reduzir o parasitismo por monogenóides do gênero *Gyrodactylus* em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (EL-GALIL & ABOELHADID, 2012), em lebistes (*Poecilia reticulata*) (SHELKLE et al., 2013; FRIDMAN et al., 2014) e *Neobenedenia* spp. em barramundi (*Lates calcarifer*) (MILITZ et al., 2014).

O extrato aquoso de alho adicionado à ração (200 ml/kg) e ofertada à *Clarias batrachus* por 90 dias foi eficiente em reduzir a prevalência de acantocéfalos em 80% (ROSNY et al., 2016).

Além do efeito antiparasitário, a planta apresenta potencial também no controle de bactérias patogênicas de peixes, como a *Aeromonas hydrophila* (SAHU et al., 2006).

2.4.3 Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*)

Nativa da Austrália e conhecida como árvore de chá é usado como um antisséptico e desinfetante há décadas (THOMSEN et al., 2011). Os componentes mais importantes do óleo essencial de *M. alternifolia*, os monoterpenos, apresentam efeito inibitório na respiração celular de fungos e bactérias, além de alterar a estrutura e permeabilidade da membrana celular destes organismos, exercendo assim, efeito inibitório sobre estes patógenos (COX et al., 2000).

Em peixes, o óleo essencial de *M. alternifolia* apresentou eficácia *in vitro* e *in vivo* contra *Ichthyophthirius multifiliis* em pacus (VALLADÃO et al., 2014), redução do parasitismo por *Gyrodactilus* spp. (STEVEDING et al., 2005) e melhora a sobrevivência de *Rhamdia quelen* durante infecções bacterianas por *Pseudomonas aeruginosa*, utilizado na forma livre ou micro encapsulado (SOUZA et al., 2016).

2.4.4 Manjeriço (*Ocimum basilicum*)

Plantas do gênero *Ocimum* vêm sendo estudadas para o controle de patógenos em peixes. Em estudo realizado *in vivo*, Boijink et al. (2016), utilizaram óleo essencial de *O. gratissimum* e obtiveram eficácia de 100% contra monogenóides nas brânquias de tambaquis, a partir da concentração de 10mg/l, e ausência de efeitos deletérios nos parâmetros hematológicos.

A associação de *O. sanctum* com *Azadiractha indica* e *Curcuma longa*, administrada à ração foi eficaz em prevenir a mortalidade por *Aeromonas hydrophila* em *Carassius auratus* e reduzi-la significativamente em *Cyprinus carpio* (HARIKRISHNAN et al., 2009 e 2010).

2.4.5 Menta (*Mentha piperita*)

Pertencente a família Lamiaceae, a *M. piperita* é amplamente utilizada na medicina popular de vários países (MALAQUIAS et al., 2014). Em peixes, há pesquisas avaliando o potencial para a aplicação deste produto contra diversos patógenos, inclusive contra helmintos (MALHEIROS et al., 2016; HASHIMOTO et al. 2016).

A eficácia *in vitro* do óleo essencial do hortelã pimenta, foi testado contra *Dawestrema* spp., monogenóide de pirarucu (*Arapaima gigas*) e o óleo eliminou 100% dos parasitos nas concentrações de 160mg/L e 320mg/L, no entanto, efeitos tóxicos no hospedeiro limitaram a exposição às concentrações de 20mg/L e 40mg/L (MALHEIROS et al., 2016). Já aplicado na forma de banho (40 mg/L), este fitoterápico mostrou efeito anti-helmíntico contra monogenóides em tilápia-do-Nilo, sem causar efeitos deletérios nos parâmetros hematológicos (HASHIMOTO et al., 2016).

Além do efeito anti-helmíntico, este fitoterápico também foi avaliado como imunestimulante. O extrato das folhas do hortelã pimenta, adicionado à ração da perca-gigante (*Lates calcarifer*) mostrou efeito imunestimulante no peixe e maior sobrevivência após desafio com a bactéria *Vibrio harveyi* (TALPUR, 2014).

1 Tabela 1: Uso de fitoterápicos no controle de patógenos de peixes

Fitoterápico		Patógeno	Hospedeiro	Tratamento		Resultado	Referência
Planta	Forma de uso			Via	Dose efetivas		
<i>Allium sativum</i>	Extrato aquoso	<i>Acanthocephala</i>	<i>Clarias batrachus</i>	Ração	200ml/kg	Redução de 80% da prevalência 70,3%, 99,21% e 100% de inibição do crescimento de acordo com a dose.	Rosny <i>et al.</i> , 2016
		<i>Spironucleus vortens</i>	<i>Symphysodon discus</i>	Ensaio <i>in vitro</i>	25, 50 e 100mg/l		Puk & Guz, 2014
	Não informado	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Labeo rohita</i>	Ração	0%, 0.1%, 0.5% e 1.0%	Aumento na produção de superóxidos, lisozima, maior atividade bactericida do soro, aumento na sobrevivência ao desafio.	Sahu <i>et al.</i> , 2007
<i>Armoracia rusticana</i>	Extrato alcoólico e aquoso	<i>Spironucleus vortens</i>	<i>Symphysodon discus</i>	Ensaio <i>in vitro</i>	25, 50 e 100mg/l	58,96% a 100% de inibição do crescimento de acordo com a dose.	Puk & Guz, 2014
<i>Citrus limon</i> (cascas)	Óleo essencial	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Oreochromis mssambicus</i>	Ração	0,5%; 0,75%; 1%	Melhora na sobrevivência	Baba <i>et al.</i> , 2016
<i>Curcuma longa</i>	Curcumina	<i>Ichthyophthirius multifilis</i>	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	Ensaio <i>in vitro</i>	8mg/l	100% de eficácia	Liu <i>et al.</i> 2017
Eugenol	Solução alcoólica	Monogênea	<i>Colossoma macropomum</i>	Banho	5, 10 e 15mg/l	Redução de até 79% da carga parasitária	Boijink <i>et al.</i> , 2015
<i>Lavandula augustifolia</i>	Óleo essencial	<i>Ichthyophthirius multifilis</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Ensaio <i>in vitro</i>	57µl/l à 455µl/l	45,62% a 100% de eficácia de acordo com a dose	Valladão, 2014
<i>Lippia organoides</i>	Óleo essencial	Monogenea	<i>Colossoma macropomum</i>	Banho	20 e 40mg/l	Doses testadas não foram efetivas	Soares <i>et al.</i> , 2017
				Ensaio <i>in vitro</i>	160 and 320 mg/L	100% de eficácia	Soares <i>et al.</i> , 2017
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Óleo essencial livre e microencapsulado	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	Banho	50 µL L- 1	Maior sobrevivência	Souza <i>et al.</i> , 2017
		<i>Gyrodactylus spp.</i>	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Banho	3, 10 e 30ppmv	Redução na prevalência e abundância	Steverding <i>et al.</i> , 2005
	Óleo essencial	<i>Ichthyophthirius multifilis</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Ensaio <i>in vitro</i> e banho	57µl/l à 455µl/l (<i>in vitro</i>); 50µl/l (<i>in vivo</i>)	Eficácia superior a 70% (<i>in vitro</i>); 99,8% e 98,9% de eficácia contra <i>I. multifilis</i> em pele e brânquias (<i>in vivo</i>)	Valladão, 2014

<i>Mentha piperita</i>	Óleo essencial	<i>Dawestrema</i> spp. (Monogenea)	<i>Arapaima gigas</i>	<i>in vitro</i> e banho	160 e 320mg/l (<i>in vitro</i>); 40mg/l (<i>in vivo</i>)	100 % de eficácia <i>in vitro</i> ; pequena redução na intensidade média (<i>in vivo</i>)	Malheiros et al, 2016
		Monogenea	<i>Oreochromis niloticus</i>	Banho	40mg/l	Redução da intensidade média	Hashimoto et al, 2016
		<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Ensaio <i>in vitro</i>	57µl/l à 455µl/l	45,16% a 100% de eficácia de acordo com a dose	Valladão, 2014
	Pó das folhas	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Lates calcarifer</i>	Ração	5g/kg	70% de sobrevivência ao desafio	Talpur, 2014
<i>Ocimum gratissimum</i>	Óleo essencial	Monogenea	<i>Colossoma macropomum</i>	Banho	5, 10 e 15mg/l	100% de eficácia a 15mg/l	Bojink et al., 2016
<i>Origanum heracleoticum</i>	O.E, Thymol e carvacrol isolados e em associação	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	Ração	0,05%	sobrevivência crescente após desafio nos peixes tratados com carvacrol, timo+carvacrol e O.E.	Zheng <i>et al.</i> , 2009
<i>Origanum minitiflorum</i>	Óleo essencial	<i>Myxobolus sp.</i>	<i>Diplodus puntazzo</i>	Ração	1,6ml/kg PV	Redução de 36,98% na prevalência	Karagouni <i>et al.</i> , 2005
<i>Origanum vulgare</i>	Extrato alcoólico e aquoso	<i>Spironucleus vortens</i>	<i>Symphysodon discus</i>	Ensaio <i>in vitro</i>	25, 50 e 100mg/l	26,98%, 82,08% e 100% de inibição do crescimento de acordo com a dose.	Puk & Guz, 2014
<i>Rosmarinus officinali</i>	Pó	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Ração	1%	Redução da mortalidade	Yilmaz et al., 2013
<i>Tanacetum vulgare;</i>	Extrato alcoólico e aquoso	<i>Spironucleus vortens</i>	<i>Symphysodon discus</i>	Ensaio <i>in vitro</i>	25, 50 e 100mg/l	64,73% a 99,57% de inibição do crescimento de acordo com a dose.	Puk & Guz, 2014
<i>Thymus vulgaris</i>	Extrato alcoólico	<i>Spironucleus vortens</i>	<i>Symphysodon discus</i>	Ensaio <i>in vitro</i>	25, 50 e 100mg/l	45,16% a 100% de eficácia de acordo com a dose	Puk & Guz, 2014
	Óleo essencial	<i>Anisakis sp</i> (larvas)	<i>Lepidopus caudatus</i>	Ensaio <i>in vitro</i>	0,1%, 0,5%, 1%, 5% e 10%	100% das larvas inativadas	Giarratana et al. 2014
	Pó	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Ração	1%	Redução da mortalidade	Yilmaz et al., 2013
<i>Thymus zygis</i>	Óleo essencial	Não se aplica	<i>Sparus aurata</i>	Ração	500mg/kg	Melhora em características sensoriais pós na carne do peixe	Hernandez <i>et al.</i> , 2015
<i>Trigonella foenum graecum</i>	Pó	<i>Streptococcus iniae</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Ração	1%	Redução da mortalidade	Yilmaz et al., 2013
Associação de <i>Dioscorea zingiberen</i> e <i>Ginkgo biloba</i>	Extrato alcoólico	<i>Dactylogyrus spp</i>	<i>Carassius auratus</i>	Banho	Combinações dos dois extratos em diferentes proporções	Maior eficácia dos fitoterápicos quando em associação	Jiang <i>et al.</i> , 2014

Associação de *Thymus vulgaris* e *Foeniculum vulgare*

Óleo essencial

Yersinia ruckeri

Oncorhynchus mykiss

Ração

1ml/kg de ração

Melhora no perfil bioquímico

Gulec et al, 2013

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, a atividade anti-helmíntica, *in vitro*, dos óleos essenciais de *Allium sativum*, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum* e *Thymus vulgaris* contra o endoparasito *Neoechinorhynchus buttnerae* e analisar o efeito do OE de maior atividade, sobre a saúde de juvenis de tambaqui.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar quais concentrações dos cinco óleos essenciais testados possui atividade anti-helmíntica contra o acantocéfalos;
- Avaliar as respostas hematológica, metabólica de tambaquis saudáveis, através da adição à ração do óleo essencial com melhor resultado *in vitro* contra o parasito;
- Avaliar o consumo da ração experimental, contendo óleo essencial de tomilho pelos peixes;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Peixes

Foram encaminhados ao laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos, do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) 30 juvenis de tambaqui ($48,96 \pm 9,67$ g de peso e $17,77 \pm 4,22$ cm de comprimento) de uma estação de piscicultura comercial localizada na região norte do Brasil, no

Estado de Rondônia, naturalmente infectados por *Neoechinorhynchus buttnerae* com elevada taxa mortalidade em peixes de diferentes faixas etárias.

Os animais foram alojados em duas caixas plásticas circulares, com capacidade para 310 litros de água, em sistema estático, com uma troca parcial de água de aproximadamente 20% do volume uma vez ao dia, onde foram alimentados uma vez ao dia, com ração comercial para peixes onívoros (32% PB - Trouw Nutrition) e mantidos nestas condições até a realização de todos os testes *in vitro*.

Pra o ensaio *in vivo* foram utilizados 90 juvenis de tambaqui com peso médio de $135,53 \pm 15,16$ g, comprimento total de $20,08 \pm 0,97$ cm e comprimento padrão de $17,20 \pm 1,01$ cm, provenientes da estação de piscicultura do CAUNESP. Destes, dez animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia por secção de medula para avaliação parasitológica antes da condução do ensaio.

4.2 Coleta dos parasitos

Para a coleta dos parasitos, os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína (1 g/10 litros de água) até que cessassem os movimentos operculares. Em seguida, procedeu-se a eutanásia dos mesmos através de secção medular. Os animais foram dissecados para a remoção do trato digestório, o qual foi aberto e lavado com solução de salina (0,85%) para a remoção dos helmintos. Os parasitos que se encontravam fixados à mucosa intestinal foram retirados por raspagem delicada ou extração com pinça anatômica. Os helmintos obtidos foram contados para determinação da abundância parasitária.

Quarenta espécimes foram depositados em placas de Petri contendo água destilada, levadas à geladeira por duas horas até a exposição da probóscide.

Após, os parasitos foram transferidos para frascos contendo solução alcoólica (75%) para fixação e posterior identificação da espécie por técnicas de microscopia óptica.

4.3 Identificação dos parasitos

A preparação dos espécimes para observação em microscopia foi conduzida conforme descrito por PETROCHENKO (1971 Apud Eiras et al. 2000). Os espécimes, fixados em álcool (75%), foram colocados sobre lâmina de microscopia e cobertos com uma gota de glicerina (25%) para o clareamento, e posteriormente, cobertos com lamínula, para observação das estruturas nos exemplares menores. Para espécimes maiores, a concentração de glicerina foi aumentada para 50% introduzindo-se a solução entre lâmina e lamínula com auxílio de uma pipeta.

Após o preparo, os parasitos foram examinados em microscópio óptico, equipado com câmera fotográfica, em aumento de 40X e 100X. As microfotografias foram utilizadas para observação dos aspectos morfológicos relevantes para a identificação da espécie.

A identificação dos parasitos foi realizada com base nas características morfológicas como forma, tamanho e disposição dos ganchos na probóscide, tamanho e posição dos testículos, forma da glândula de cimento, tamanho e forma dos ovos, de acordo com o proposto por EIRAS et al. (2000).

4.4 Óleos essenciais

Foram utilizados cinco óleos essenciais puros de alho (*Allium sativum*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*), manjerição

(*Ocimum basilicum*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), adquiridos da empresa Phytoterapica®. A identificação e avaliação dos constituintes de cada óleo essencial foi realizada no Laboratório de Cromatografia, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Minas Gerais, através da cromatografia gasosa, com sistema cromatográfico composto por GC-MS Agilent 6890N equipado com detector seletivo de massas HP5975, injetor automático 7683B e coluna capilar HP5 (30 x 0,25mm; 0,25µm).

4.5 Ensaio *in vitro*

O ensaio *in vitro* foi conduzido em 130 placas de Petri (26 placas para cada óleo essencial), contendo dez acantocéfalos e 20ml de solução salina (0,85%) por placa, seguindo a metodologia proposta por CUSTÓDIO-COSTA et al. (2017) com adaptações, para avaliar a atividade anti-helmíntica de cada óleo essencial sobre os acantocéfalos.

Para permitir a solubilização dos OE na solução salina, cada óleo foi previamente diluído em dimetilsulfóxido (DMSO- Sigma-Aldrich®) na proporção de uma parte de OE para 20 partes de DMSO. Cada óleo essencial foi testado através da inoculação de 20µl, 40µl, 80µl e 160µl da solução em DMSO nas placas de Petri contendo os parasitos e solução salina, resultando na exposição dos acantocéfalos às concentrações 50mg/l, 100mg/l, 200mg/l e 400mg/l de cada óleo essencial. Cada grupo experimental, contou com cinco repetições. Dois grupos controle forem utilizados: solução salina (0,85%) e solução salina + DMSO (solução solubilizante).

Os parasitos foram monitorados a cada 15 minutos durante duas horas, e considerados mortos os que permaneceram imóveis após estimulação mecânica com uma agulha.

4.6 Ensaio *in vivo*

4.6.1 Desenho experimental

Oitenta peixes foram divididos em quatro grupos, alimentados com ração contendo diferentes níveis de inclusão de O.E. de *T. vulgaris*, 0% (controle), 1% (T1), 2% (T2) e 3% (T3). Os animais foram distribuídos em 16 caixas plásticas de 100 litros, mantidos em renovação constante de água e aeração suplementar, alimentados uma vez ao dia com ração comercial para peixes onívoros (32% PB - Trouw Nutrition) e mantidos nessas condições para aclimatação durante 15 dias até o início do experimento.

Diariamente, foram preparadas dietas contendo 0%, 1%, 2% e 3% de óleo essencial de *T. vulgaris*, adicionando-se o óleo a uma ração comercial para peixes onívoros (32% de proteína bruta) misturados manualmente até a completa homogeneização. Para facilitar a incorporação, nas dietas contendo 1 e 2% de O.E., estes foram previamente diluídos em óleo de soja até que se completasse 3% do peso da ração. A dieta isenta de fitoterápico foi adicionada a 3% de óleo de soja. Depois de preparada, as rações foram mantidas refrigeradas até o momento da utilização. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com as rações experimentais (4% do peso vivo), divididas em duas parcelas, pela manhã, e ao final da tarde durante 15 dias.

4.6.2 Colheita sanguínea

Ao final de 15 dias de alimentação, três peixes de cada caixa, totalizando 12 animais por tratamento foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína (1 g/10 litros de água) até que cessassem os movimentos operculares. Em seguida, uma amostra de sangue foi coletada por punção do vaso caudal com seringas estéreis.

4.6.3 Análises hematológicas

Para preparo das extensões sanguíneas, uma gota de sangue sem anticoagulante foi colocada diretamente sob uma lâmina de microscopia e com auxílio de uma extensora, o sangue foi espalhado e a lâmina deixada secar em temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período, as lâminas, em duplicata, foram coradas utilizando o método de Rosenfeld (1947) e posteriormente analisadas em microscópio óptico (aumento de 1000X) para a contagem para total e diferencial de trombócitos e leucócitos (Hrube & Smith, 1998). Para a determinação da quantidade de eritrócitos (RBC), foi utilizada uma alíquota de 10µl de sangue já contendo anticoagulante adicionada a dois ml de formol citrato e, posteriormente, os eritrócitos totais foram contados em câmara de Neubauer. O hematócrito foi determinado através da centrifugação do sangue contendo anticoagulante em centrífuga de microhematócrito a 1500 g por cinco minutos (Goldenfarb et al., 1971). A determinação da quantidade de hemoglobina presente no sangue foi realizada através do método da cianometahemoglobina (Collier, 1944). Foram utilizadas as equações hematimétricas de acordo com Wintrobe (1934) para a determinação do volume corpuscular médio (VCM), concentração

de hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Volume corpuscular médio (VCM):

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{RBC}}$$

Hemoglobina corpuscular média (HCM):

$$\text{HCM} = \frac{\text{Taxa de hemoglobina} \times 10}{\text{RBC}}$$

Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM):

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Taxa de hemoglobina} \times 100}{\text{Hematócrito}}$$

Os valores de proteínas totais do soro, albumina, aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram determinadas utilizando kit comercial Labtest® e mensuradas em espectrofotômetro (Unico 2100 Espectrofotômetro) de acordo com as instruções do fabricante. Os valores de globulina foram obtidos através da subtração da quantidade de albumina da proteína total. Os resultados foram expressos em g dl⁻¹.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.1 Ensaio *in vitro*

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 7.00. Os valores de sobrevivência dos parasitos foram expressos como média ± desvio padrão da média. Os dados foram testados para normalidade pelo método Kolmogorov-Smirnov e as diferenças pelo teste de Kruskal-Wallis e posteriormente comparadas aos controles pelo teste de Dunn.

5.2 Ensaio *in vivo*

A distribuição dos dados foi testada para a normalidade pelo método de Shapiro-Wilk. Os dados que apresentaram distribuição normal tiveram as diferenças avaliadas por análise de variância ANOVA e as diferenças comparadas pelo teste de Tukey.

6. RESULTADOS

6.1 Análise dos óleos essenciais

As composições centesimais dos óleos essenciais utilizados neste estudo encontram-se na Tabelas 2. A análise cromatográfica gasosa realizada confirmou a identidade dos cinco óleos comerciais utilizados.

Os componentes majoritários do óleo essencial de alho foram dialil-disulfeto e dialil trissulfeto(57%), do óleo essencial de manjeriço olinalol e o estragol (92%), do óleo essencial de melaleuca o γ -terpineno (15,3%) e o terpinen-4-ol (46,8%). Os compostos mentona e mentol corresponderam a 67,3% da composição do OE de hortelã pimenta. Já o óleo essencial de tomilho mostrou o timol como componente mais abundante (50,3%), seguido de o-cimeno (20,8%), linalol (9,1%) e carvacrol (8,9%).

1 Tabela 2. Composição centesimal dos óleos essenciais de *A. sativum*, *O. basilicum*, *M. alternifolia*, *M. piperita* e *T. vulgaris*

Componente	Óleos essenciais				
	<i>Allium sativum</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Mentha piperita</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
alil metil disulfeto	9,30%				
1,8-cineol		0,40%	2,30%	5,30%	1,40%
3-metoxo octano	0,50%				
acetato bornila		0,60%			
acetato fenchila		0,40%			
acetato mentila				4,60%	
alil metil tetrasulfeto	2,80%				
alil metil trisulfeto	6,60%				
Canfora		0,10%			
carvacrol					8,90%
cis-calameno			1%		
dehidrocarvona					1%
dialil disulfeto	23,30%				
dialil tetrasulfeto	13%				
dialil trisulfeto	33,70%				
dimetil tetrasulfeto	1%				
dimetiltrisulfeto	2,30%				
dipropil disulfeto	1,20%				
Estragol		69,70%			
isoborneol					1,70%
isomentona				4,90%	
isopulegol				2,50%	
limoneno		0,20%	2%	2%	1,20%
Linalool		22,30%			9,10%
Menteno		0,30%			

mentofurano			2,50%	
Mentol			38,10%	
mentona			29,20%	
Mirceno	0,10%	0,60%		0,40%
neo-isomentol			2,80%	
o-cimeno				20,80%
oxido cariofileno	0,60%			
p-cimeno		5,60%		
piperitona			0,80%	
pulegona			2%	
sabineno		0,50%		
terpinen-4-ol		46,80%		
terpinoleno	0,30%	3,60%		0,20%
Timol				50,30%
timol metil eter				0,60%
t-ocimeno	0,10%			
viridiflorino		1,30%		
α -felandreno		0,40%		
α -pineno	0,20%	4,60%	0,80%	1,30%
α -terpineol		3,40%		
α -terpineno		7,70%		1,60%
α -thujeno		0,60%		
β -cariofileno	0,60%			0,70%
β -gurjuneno		0,90%		
β -pineno		1,30%	0,20%	
γ -terpineno		15,30%		0,20%
δ -cadineo	1%			
Outros	6,40%			0,70%

6.2 Identificação dos parasitas

A identificação dos parasitas, realizada com base nas características morfológicas confirmou se tratar do gênero *Neoechynorhynchus*.

A observação dos espécimes ao microscópio revelou a presença de probóscide relativamente pequena em relação ao corpo, dotada de três tipos de ganchos: grandes superiores, médios e pequenos inferiores arranjados em seis linhas (Figura 2). Os ganchos médios e inferiores apresentam um alinhamento em um único plano, enquanto os maiores apresentaram ganchos superiores em dois planos entrepostos. Os machos apresentaram poro genital terminal, enquanto nas fêmeas, o mesmo apresentou localização subterminal(Figura 3).



Figura 2: Microfotografia de *N. buttnerae* evidenciando a probóscide provida de ganchos grandes (G), médios (M) e pequenos (C).

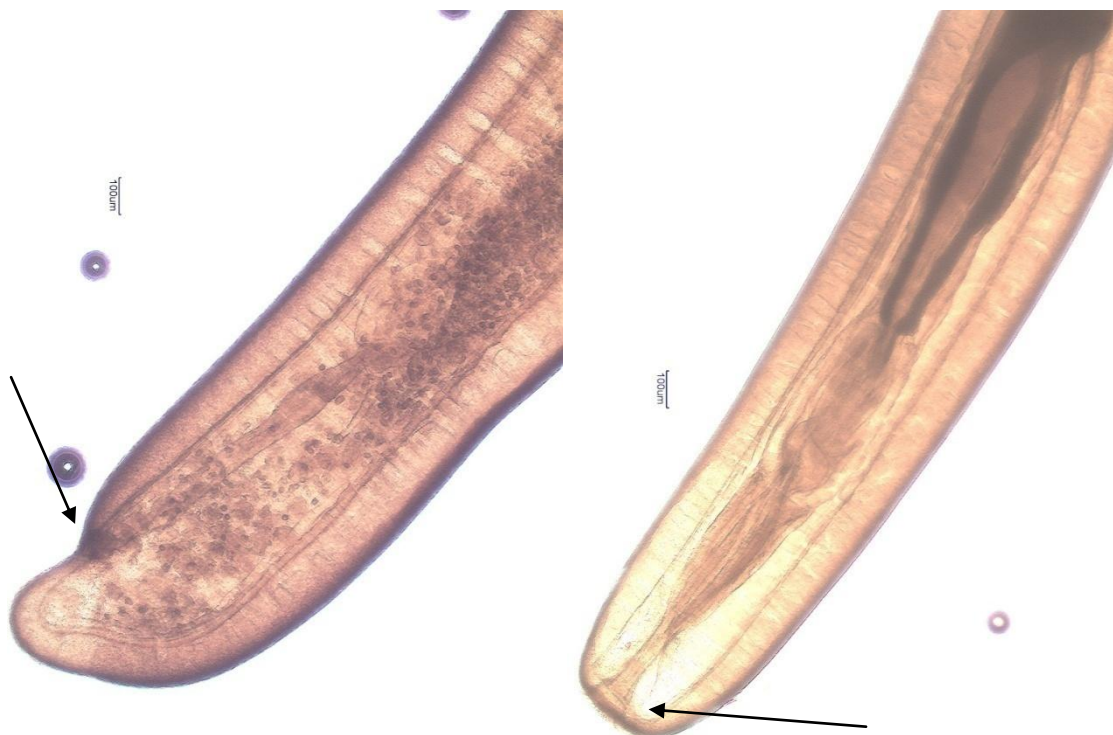


Figura 3: Microfotografia da região posterior dos acantocéfalos mostrando posição do poro genital subterminal na fêmea e terminal no macho (setas).

6.3 Índices parasitários

Os peixes apresentaram grande quantidade de parasitos distribuídos por todo intestino. O número médio de parasitos encontrados por peixe foi $338,8 \pm 148,38$. A prevalência observada foi de 100%.

6.4 Ensaio *in vitro*

O ensaio *in vitro* revelou que todos os óleos essenciais testados apresentaram alguma atividade contra o parasito *N. buttnerae*, no entanto, através da análise geral de todas as concentrações testadas (50 mg/L a 400 mg/L), os óleos essenciais de tomilho e alho apresentaram maiores atividades contra o parasito.

Na concentração mais baixa testada (50 mg/L), o óleo essencial de tomilho se destacou em comparação a todos os outros grupos, sendo o único tratamento

estatisticamente diferente do grupo controle. Após 120 minutos de exposição, o óleo essencial de tomilho inativou mais de 40% dos parasitos expostos a esta concentração (Figura 4).

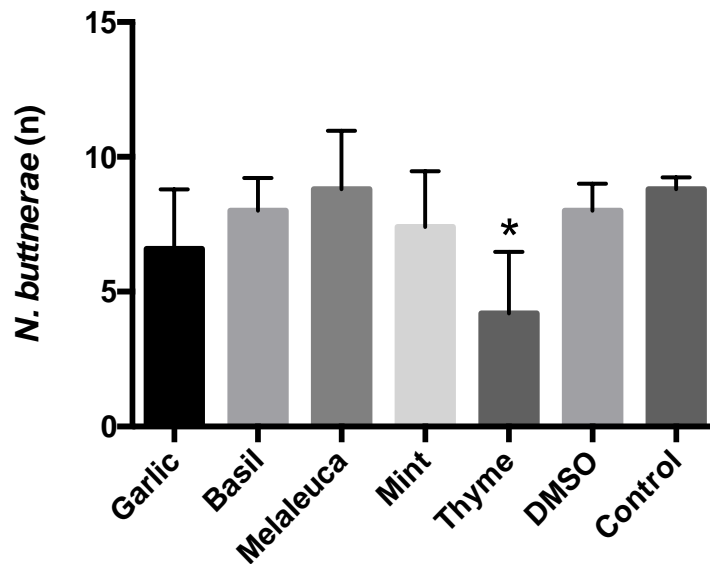


Figura 4: Sobrevivência média dos acantocéfalos expostos aos O.E.s de *A. sativum*, *M. alternifolia*, *M. piperita*, *O. basilicum* e *T. vulgaris*, contra *N. buttnerae* na concentração de 50mg/L. “*” indica diferença estatística entre o tratamento e o controle ($P < 0,05$).

O óleo essencial de tomilho também se destacou na concentração de 100 mg/L, com apenas 30 minutos de exposição, já havia inativado quase 60% dos parasitos. Ao final, o tomilho inativou cerca de 80%, o alho cerca de 60%, e a menta 30%. Embora numericamente o alho tenha se mostrado superior, a análise estatística revelou diferença significativa apenas entre o O.E. de hortelã pimenta e de tomilho em relação ao controle (FIGURA 6).

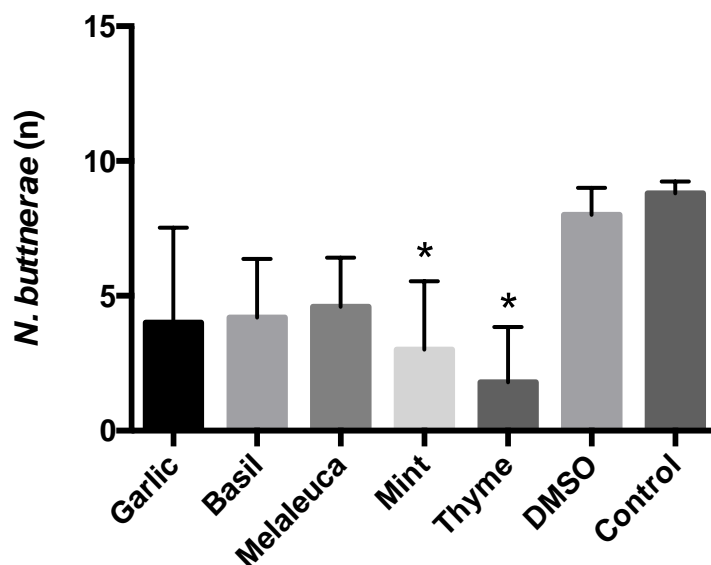


Figura 5: Sobrevivência média dos acantocéfalos expostos aos O.E.s de *A. sativum*, *M. alternifolia*, *M. piperita*, *O. basilicum* e *T. vulgaris*, contra *N. buttnerae* na concentração de 100mg/L. “*” indica diferença estatística entre o tratamento e o controle ($P < 0,05$).

Na concentração de 200mg/L, todos os fitoterápicos testados apresentaram efeito sobre os parasitas, diminuindo sua sobrevivência em relação ao controle, sendo que os óleos essenciais de tomilho e alho mataram 100% dos parasitas, enquanto o hortelã pimenta, a melaleuca e o manjeriço $90 \pm 17,32\%$, $78,18 \pm 22,93\%$ e $66 \pm 20,74\%$ (Figura 6).

Todos os óleos essenciais apresentaram atividade contra o *N. buttnerae* na concentração mais alta, sendo estatisticamente diferentes dos grupos controles em todos os tempos analisados. No entanto, novamente, o óleo essencial de tomilho mostrou um rápido efeito sobre os acantocéfalos, inativando 100% destes em apenas 30 minutos de teste. Ao final de 120 minutos de exposição, a sobrevivência dos parasitas foi inferior a 2% em todos os tratamentos (Figura 7).

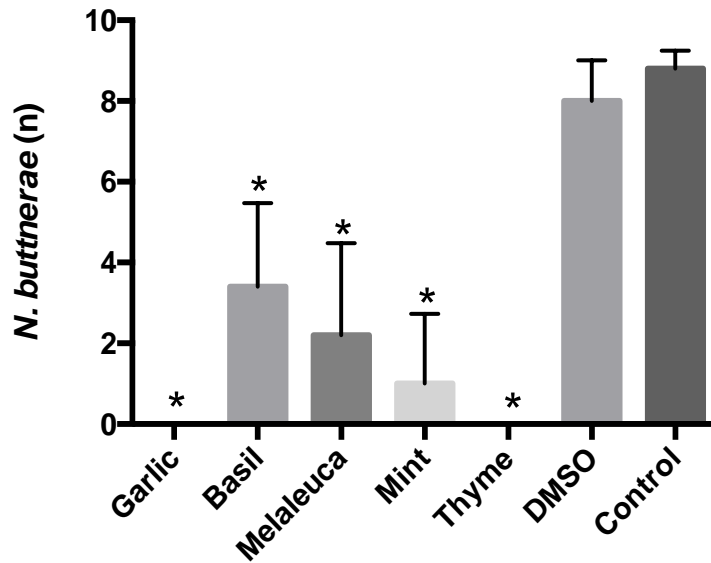


Figura 6: Sobrevivência média dos acantocéfalos expostos aos O.E.s de *A. sativum*, *M. alternifolia*, *M. piperita*, *O. basilicum* e *T. vulgaris*, contra *N. buttnerae* na concentração de 200mg/L. “*” indica diferença estatística entre o tratamento e o controle ($P < 0,05$).

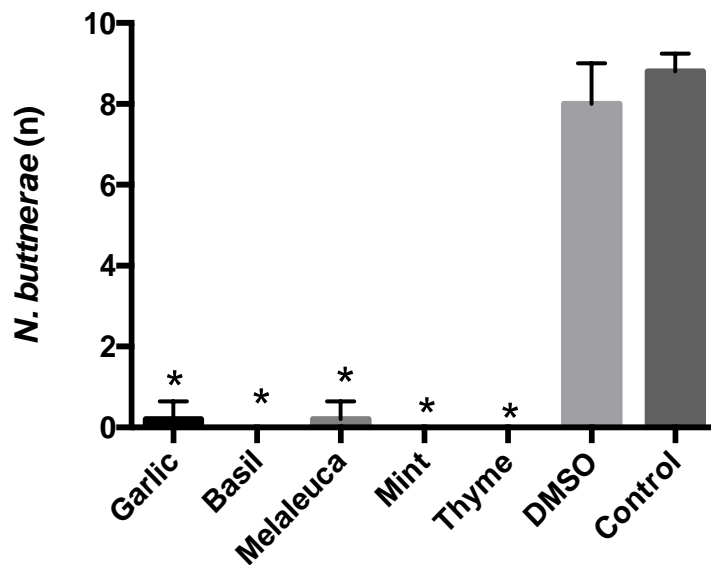


Figura 7: Sobrevivência média dos acantocéfalos expostos aos O.E.s de *A. sativum*, *M. alternifolia*, *M. piperita*, *O. basilicum* e *T. vulgaris*, contra *N. buttnerae* na concentração de 400mg/L. “*” indica diferença estatística entre o tratamento e o controle ($P < 0,05$).

6.5 Ensaio *in vivo*

A hematologia do tabaqui alimentado com ração contendo diferentes concentrações do óleo essencial e tomilho não tiveram mudanças significativas. A contagem de eritrócitos (RBC), hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, e CHCM não diferiram entre os tratamentos, e, quando diferiram, foram iguais ao grupo controle (Tabela 3).

Com relação aos leucócitos, apesar de não serem encontradas diferenças significativas entre as diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho e o grupo controle, o grupo que recebeu 2% do óleo apresentou média de leucócitos superior às demais concentrações e ao grupo controle. Já para a contagem diferencial de leucócitos, todas as células (trombócitos, monócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e célula granulocítica especial) não diferiram estatisticamente do grupo controle, todavia, o grupo que alimentado com ração contendo 2% de óleo essencial de tomilho apresentaram sempre maior quantidade de células de defesa que as demais concentrações e grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros hematológicos de tabaqui alimentado com diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho (*T. vulgaris*) durante 15 dias.

		Controle		<i>T. vulgaris</i>		
				1%	2%	3%
Hematócrito	%	30,9 ± 2,2	31,9 ± 1,7	32,3 ± 1,7	30,2 ± 2,2	
Eritrócitos	cel X 10 ⁶ /μl	1,64 ± 0,38 ^{AB}	1,73 ± 0,44 ^B	1,95 ± 0,25 ^A	1,80 ± 0,23 ^B	
Hemoglobina	g/dl	7,06 ± 0,57 ^{AB}	7,42 ± 0,48 ^{AB}	7,58 ± 0,44 ^A	6,87 ± 0,69 ^B	
VCM	fl	206,8 ± 89,9	215,4 ± 13,8	166,0 ± 17,3	169,7 ± 17,3	
HCM	pg/cel	47,4 ± 22,5	49,6 ± 31,2	38,9 ± 3,4	38,6 ± 4,5	
CHCM	g/dl	22,9 ± 1,7	22,8 ± 1,5	24,5 ± 1,3	22,8 ± 1,7	
Leucócitos totais	cel/μl	12.792 ± 5798	11.764 ± 3859	17.319 ± 6326	11.199 ± 1676	
Trombócitos	cel/μl	15819 ± 9 829	14898 ± 11 857	12320 ± 6 469	13565 ± 7 778	
Monócitos	cel/μl	543,0 ± 569,7	747,2 ± 569,7	1013,8 ± 777,1	725,4 ± 366,0	
Linfócitos	cel/μl	11749 ± 5201	9809 ± 3236	12170 ± 4898	9496 ± 1728	

Neutrófilos	cel/ μ l	713 \pm 92,4	1018 \pm 1 102	1383 \pm 1 126	824 \pm 485
Eosinófilos	cel/ μ l	73,8 \pm 92,43	146,6 \pm 228,2	211,4 \pm 200,1	107,7 \pm 92,0
Basófilos	cel/ μ l	0	0	0	5,9 \pm 19,7
CGE	cel/ μ l	39,8 \pm 72,0	42,8 \pm 56,2	72,7 \pm 103,7	39,1 \pm 34,6

A suplementação alimentar com diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho não influenciou os parâmetros bioquímicos do tambaqui após 15 dias de alimentação ($P > 0.05$), com exceção da quantidade de proteínas, que foi superior nos peixes alimentados com dieta contendo 3% do óleo essencial, diferindo dos demais grupos experimentais. Os resultados da ALT, AST, proteínas, albumina e globulina estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos de tambaqui alimentado com dieta contendo diferentes concentrações de óleo essencial de tomilho (*T. vulgaris*) durante 15 dias.

	Unidade	Controle	<i>T. vulgaris</i>		
			1%	2%	3%
ALT	(UI/L ⁻¹)	6,3 \pm 1,4	5,9 \pm 2,3	5,9 \pm 1,4	5,7 \pm 1,4
AST	(UI/L ⁻¹)	59,5 \pm 16,8	62,8 \pm 17,6	58,0 \pm 18,8	57,7 \pm 17,6
Proteína	(g dL ⁻¹)	3,54 \pm 0,97	3,63 \pm 1,00	3,71 \pm 0,94	3,16 \pm 0,87*
Albumina	(g dL ⁻¹)	0,88 \pm 0,32	0,74 \pm 0,24	0,69 \pm 0,20	0,69 \pm 0,21
Globulina	(g dL ⁻¹)	2,66 \pm 0,86	2,88 \pm 0,87	2,68 \pm 0,8	2,47 \pm 0,73

ALT = alanina aminotransferase; AST = aspartatoaminotransferase

Não foram observadas sobras de ração em qualquer uma das unidades experimentais, indicando que a inclusão de até 3% de óleo essencial de tomilho na ração não diminui seu consumo.

7. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram prevalência parasitária de 100% nos juvenis de tambaqui e a identificação morfológica confirmou tratar-se da espécie *Neoechynorhynchus buttnerae*. A intensidade parasitária de $338,8 \pm 148,38$ foi semelhante à encontrada por outros pesquisadores em peixes de criação (JERÔNIMO et al., 2017; MALTA et al., 2001; MATOS et al., 2017; SILVA-GOMES et al., 2017). Ambos, prevalência e intensidade parasitária foram superiores aos índices encontrados por Fischer et al., (2003) em ambiente natural, corroborando a hipótese de que a piscicultura favorece a infestação por *N. buttnerae*.

No entanto, durante um levantamento parasitário realizado em tambatingas em dez pisciculturas no município de Macapá, no Amapá, Dias et al. (2015), relataram a presença de *N. buttnerae* em apenas uma delas, com prevalência de 43,8% e intensidade média de 44 ± 39 , bem inferior a observada em tambaquis.

Com relação aos fitoterápicos utilizados, o óleo essencial de tomilho e de alho demonstraram, *in vitro*, grande potencial para o controle de acantocéfalos em tambaqui, mesmo nas concentrações mais baixas utilizadas.

A eficácia *in vitro* desses óleos tem sido demonstrada em vários trabalhos, principalmente contra monogenóide e protozoários parasitos de peixes, sendo escassa a literatura desses compostos contra endoparasitas (STEVERDING et al., 2005; REVERTER et al., 2014; VALLADÃO et al., 2016; COSTA et al., 2017).

A eficácia do extrato aquoso de alho contra acantocéfalos parasitos de *Clarias batrachus* foi avaliada por Rosny et al. (2016) e os autores observaram mortalidade de 20% a 80% dos helmintos expostos às concentrações de 50ml/L à

200ml/L respectivamente, concentrações superiores às utilizadas para o óleo essencial de alho em nosso estudo e que foi suficiente para inativar 100% de *N. buttnerae*.

Na tentativa de controlar monogenéticos de tabaquis, foram avaliados os compostos *Lippia origanoides* (SOARES et al., 2017), eugenol e *Ocimum gratissimum* (manjeriço) através de banho (BOIJINK et al., 2015, 2016), e os resultados demonstraram que *L. origanoides* foi eficaz apenas *in vitro*, enquanto o eugenol apresentou eficácia de 79% *in vivo* e o OE de *Ocimum gratissimum* 100% de eficácia contra o parasito.

A eficácia do *O. gratissimum* em comparação com o eugenol, seu componente majoritário, observada nos estudos de Boijink et al., (2015, 2016), reforçam a hipótese de que os óleos essenciais podem apresentar maior efeito que seus componentes isolados.

Zheng et al. (2009) avaliaram o efeito da inclusão de *Origanum heracleoticum* e seus principais componentes, timol e carvacrol, na saúde e na resistência à infecção por *Aeromonas hydrophila* em *Ictalurus punctatus*. Estes autores observaram maior crescimento, melhor fator de condição e maior atividade da lisozima nos peixes alimentados com dieta suplementada com o OE, comparada ao grupo controle e aos componentes isolados. Já com relação à resistência à bactéria, os componentes isolados também foram efetivos, porém, o OE foi mais eficaz do que à associação do timol e carvacrol, e os componentes isolados foram menos efetivos que, quando associados. Esses achados corroboram a hipótese de que os componentes minoritários na composição dos OE possuem um papel importante nos seus efeitos benéficos. O timol e o carvacrol foram os componentes majoritários na composição do OE de *T. vulgaris*

utilizado nesse estudo, e a ausência de efeitos negativos na saúde dos peixes reforça seu potencial para ser usado em dietas para o controle e prevenção de doenças, uma vez que o óleo foi eficaz em matar o parasito *in vitro* e, mesmo em concentrações elevadas não provou efeitos deletérios na saúde dos animais.

Em concentrações mais elevadas, observou-se o aumento da atividade anti-helmíntica de todos os fitoterápicos testados, com OE de *T. vulgaris* e *M. piperita* sendo efetivos logo na primeira hora avaliada. Já o *A. sativum*, apresentou um padrão diferente, apesar de apresentar eficácia semelhante aos OE acima descritos, foi mais eficaz com o passar do tempo.

A exposição de larvas de nematóides anisaquídeos ao óleo de girassol adicionado ao OE de *T. vulgaris* nas concentrações de 5 e 10% resultou na mortalidade de 100% dos helmintos após 14 e 7 horas respectivamente. Avaliadas ao microscópio, as larvas apresentaram danos na cutícula e no aparato digestório (GIARRATANA et al., 2014). Assim, podemos inferir que danos à cutícula, após a exposição ao *T. vulgaris* possam ter ocorrido devido aos terpenos presentes no OE, que pode ter influenciado positivamente na eficácia deste fitoterápico.

Ao testar a eficácia do óleo essencial de *M. piperita* na concentração de 160mg/L contra *Dawestrema* spp. MALHEIROS et al. (2016) constataram mortalidade de 100% dos parasitos *in vitro*, todavia, ao realizar testes *in vivo* com pirarucus, observaram que o óleo provocou a morte de 58% dos peixes expostos já às menores concentrações do óleo (40mg/L). Assim, ressalta-se a importância de se analisar os efeitos deletérios que os fitoterápicos possam causar nos hospedeiros, bem como a importância de se utilizar fitoterápicos que possuam eficácia mesmo em concentrações baixas.

O OE de *T. vulgaris* foi o que apresentou eficácia *in vitro* contra *N. buttnerae* desde as menores concentrações. Pode-se inferir que essa comprovada eficácia deva-se aos principais compostos deste óleo, que são o timol terpenóide, seu isômero fenol carvacrol, bem como aglomerados de flavonóides e glicosídeos de flavonóides, cuja lipofilia desses compostos parece desempenhar um importante papel no dano celular causado ao parasito. Diversas pesquisas relatam a atividade tóxica de óleos essenciais de plantas contra bactérias e protozoários parasitos de peixes, através da capacidade dos monoterpenos e sesquiterpenos, que são apolares, de penetrar rapidamente na bicamada lipídica das células, produzindo modificações estruturais, como modificação da permeabilidade da membrana e provocando vazamento de íons e de outros conteúdos celulares (BAKKALI et al., 2008; VALLADÃO et al., 2016; COSTA et al., 2017). Este mecanismo de ação pode ser similar para os acantocéfalos.

A inclusão de até 3% de O.E. de tomilho na ração não alterou os parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados neste estudo. Todavia, mesmo sem demonstrar diferenças significativas, a inclusão de 2% de O.E. de tomilho aumentou consideravelmente o número de células de defesa (monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos) nos peixes. Os leucócitos são responsáveis pela defesa celular e humoral do peixes, realizando um monitoramento constante de infecções e danos teciduais (TAVARES DIAS & MORAES, 2007). Baseado nestas informações, o óleo essencial de tomilho demonstra um excelente potencial como imunoestimulante, além de excelente efeito parasiticida *in vitro* contra os acantocéfalos de tambaqui. O estudo *in vivo* demonstrou também que o

óleo essencial de tomilho é seguro para o tambaqui, uma vez que não causou efeitos tóxicos nos peixes.

A atividade das enzimas ALT e AST é aumentada quando o animal é exposto à poluição ambiental ou agentes tóxicos, mas também pode ser alterada pelos componentes de uma dieta (Zadmajid & Mohammadi, 2017). Neste estudo, a inclusão de até 3% de óleo essencial de tomilho na ração do tambaqui, administrada por 15 dias não aumentou a atividade dessas enzimas, demonstrando ser seguro para os peixes nas condições testadas.

O efeito dos fitoterápicos na saúde dos peixes pode variar de acordo com a dose, via de administração e duração do tratamento. Brum et al., (2017) avaliaram o efeito da inclusão dos óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* e *Zingiber officinale* à dieta da tilápia-do-Nilo, na hematologia desta espécie e observaram que após 35 dias de alimentação, a saúde dos peixes não foi influenciada pela dieta, entretanto, após 55 dias de alimentação, *Z. officinale* provocou redução no hematócrito, na contagem de eritrócitos e nos trombócitos, além da taxa de hemoglobina. Por outro lado, Gulec et al., (2013) observaram melhora no perfil bioquímico de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, após sete dias de alimentação com dieta suplementada com uma mistura de óleo essencial de *T. vulgaris* e *Foeniculum vulgare* (1 ml/kg de ração).

Com relação ao uso de anti-helmínticos tradicionais, a exposição de tambaquis ao praziquantel por 24 horas ocasionou redução da hemoglobina (MACIEL, 2009). Este período de exposição é muito inferior ao analisado neste estudo, corroborando a hipótese de menor risco associado aos fitoterápicos quando comparado aos anti-helmínticos convencionais.

O óleo essencial de *T. vulgaris* o mais eficaz contra acantocéfalos entre os compostos testados, apresentando excelente potencial para futuros testes *in vivo*. Juntamente com a eficácia comprovada neste estudo, a administração oral de OE. de tomilho não causou alterações hematológicas ou bioquímicas, o que torna esse óleo um potente candidato à prevenção e controle de acantocéfalos em tambaqui.

8 Referências

- ADRIANO, E. A.; ARANA, S.; CORDEIRO, N. S. Histology, ultrastructure and prevalence of *Henneguya piaractus* (Myxosporea) infeting the gills of *Piaractus mesopotamicus* (Characidade) cultivated in Brazil. **Diseases of aquatic organisms**. v. 64, p. 229-235, 2005.
- ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L. Adaptação de peixes aos ambientes de criação. **Criando peixes na Amazônia**, p. 45-58, 1995.
- AMIN, O. M. Classification of the Acanthocephala. **Folia Parasitologica**. v.60, n. 4, p. 273, 2013.
- AKINSANYA, B.; ADE-ADEMILUA, O. E.; IDRIS, O.; UKWA, U. D.; SALIU, J. K. Toxicological evaluation of plant crude extracts on helminth parasites of *Clarias gariepinus* using host low observed effect concentration (LOEC). **Egypt journal of aquatic biology**.v. 20, n.2, p. 69-77, 2016.
- ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES, L. de C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: **Editora UFMS**, p. 175-202, 2005.
- ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOULDING, Michael. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. **Brasília: Sociedade Civil Mamirauá/CNPq**, 1998.
- AZAD, I. S.; AL-YAQOULT, A.; AL-ROUMI, M. Antibacterial and immunity enhancement properties of anesthetic doses of thyme (*Thymus vulgaris*) oil and three other anesthetics in *Sparidentax hasta* and *Achantopagrus latus*. **Journal of King Saud University – Science**, v. 26, p.101-106, 2014.
- Baba, E.; Acar, Ü.; Öntaş, C.; Kesbiç, O. S.; Yılmaz, S. Evaluation of Citrus limon peels essential oil on growth performance, immune response of Mozambique

tilapia *Oreochromis mossambicus* challenged with *Edwardsiella tarda*. **Aquaculture**, v. 465, p. 13-18, 2016.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M., Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**.v.46, p.446–475, 2008.

BELO, M. A. A. et al. Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. **Journal of fish biology**, v. 82, n. 4, p. 1403-1410, 2013.

BILLER-TAKAHASHI, J. D. Imunoestimulantes e imunidade de organismos aquáticos. In MADI, R.R.; CAMPOS, C. M.; LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M. **Patologia e Sanidade em Ambientes Aquáticos** 1° Ed, Maringá: Editora Massoni, p. 295-328, 2014.

BUCHMANN, K.; SIGH, J.; NIELSEN, C. V.; DALGARD, M. Host responses against fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. **Veterinary Parasitology**.v.100,n.4, p.105-116, 2001.

BOIJINK, C. L.; MIRANDA, W. S. C; CHAGAS, E. C.; DAIRIKI, J.K.; INOUE, L. A. K. A. Antihelmintic activity of eugenol in tambaquis with monogenean gill infection. **Aquaculture**. v. 438, p.138-140, 2015.

BOIJINK, C. L.; QUEIROZ, C. A.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; INOUE, L. A. K. A. Anesthetic and antihelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**.v.457, p.24-28, 2016.

BRUM, A.; PEREIRA, S.A.; OWATARI, M. S.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; MOURIÑO, J. L. P.; MARTINS, M. L. Effect of dietary essential oils of clove basil

and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**. v.468, p. 235-243, 2017

CHAGAS, E. C.; MACIEL, P. O.; AQUINO-PEREIRA, S. L. Infecções por acantocéfalos: Um problema para a produção de peixes In: TAVARES-DIAS, M; MARIANO, W. S. **Aquicultura no Brasil: Novas perspectivas** v.1 Aspectos biológicos, fisiológicos e sanitários de organismos aquáticos, Pedro e João Editores, São Carlos, p. 305-328, 2015.

CHAGAS, E. C., PILARSKI, F., SAKABE, R., MASSAGO, H.; FABREGAT, T. E. H. P.. Suplementos na dieta para manutenção da saúde de peixes. IN TAVARES-DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Embrapa Amapá, Macapá. p. 132-225, 2009.

COLLIER, H. B. Standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 50, n. 6, p. 550, 1944.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of applied microbiology**.v.88, p.170-175, 2000.

CUSTÓDIO-COSTA, J.; VALLADÃO, G. M. R.; PALA, G.; GALLANI, S. U.; KOTZENT, S.; CROTTI, A. E. M.; FRACAROLLI, L.; SILVA, J. J. M.; PILARSKI, F. Copaifera duckei oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**. v. 471, p. 72-79, 2017

DELGADO, P. M.; DELGADO, J. P. M.; ARENAS, J. V.; ORBE, R. I.; Infestación masiva por *Perulernaea gamitanae* (Crustacea: Cyclopoida: Lernaeidae) em juveniles de gamitana, cultivados em la Amazonia peruana. **Veterinaria México**.v.42,n.1, p.59-64, 2011.

- DIAS, M. K. R.; NEVES, L. R.; MARINHO, R. G. B.; PINHEIRO, D. A. TAVARES-DIAS; M. Parasitismo em tambatinga (*Colossoma macropomum* X *Piaractus brachypomus*, Characidae) cultivados na Amazônia, Brasil. **Acta amazônica** v.45, n.2, p. 231-238, 2015.
- EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. **Diversidade dos parasitas de peixes de água doce do Brasil**, Click e Tech, Maringá, 333 p. 2010.
- EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M., PAVANELLI, G. C. **Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes**, Eduem, Maringá, 2000.
- EL-GALIL, M. A. A.; ABOELHADID, S. M. Trials for the control of trichodinosis and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. **Veterinary parasitology**, v. 185, n. 2-4, p. 57-63, 2012.
- FISHERIES, F. A. O. Aquaculture Department (2010) The state of world fisheries and aquaculture. **Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome**, 2016.
- FISCHER, C.; MALTA, J. C. O; VARELLA, A. M. B. A fauna de parasitas do tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) do médio rio Solimões, Estado do Amazonas (AM) e do baixo rio Amazonas, Estado do Pará (PA), e seu potencial como indicadores biológicos. **Acta Amazônica**.v.33, p.651-662, 2003.
- FRIDMAN, S.; SINAI, T.; ZILBERG, D.. Efficacy of garlic based treatments against monogenean parasites infecting the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). **Veterinary parasitology**, v. 203, n. 1-2, p. 51-58, 2014.
- GERY, J. **Characoids of the world**. T.H.F. Publications. New Jersey, 672p, 1977

GIARRATANA, F.; MUSCOLINO, D.; BENINATI, C.; GIUFFRIDA, A; PANEBIANCO, A. Activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Anisakis* larvae. **Experimental Parasitology**.v.142, p.7-10, 2014.

GODOI, M. M. I. M.; ENGRACIA, V.; LIZAMA, M. L. A. P.; TAKEMOTO, R. M. Parasite-host relationship between the tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier 1818) and ectoparasites, collected from fish farms in the city of Rolim de Moura, State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Acta Amazônica**.v.42,n.4, p.515-524, 2012.

GOLDENFARB; P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 1, p. 35-39, 1971.

GOLVAN, Y. J. Acanthocéphales d'amazone, redescription d'*Oligacanthorhynchus inheri* TRAVASSOS, 1916 et description de *Neoechinorhynchus buttnerae* n. sp. (Neoacanthocephala-Neoechinorhynchidae) **Annales de parasitologie humaine et comparee** 31, p. 500-524, 1956.

GOMES, L. C.; SIMÕES, L.N.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*) In BALDISSEROTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura de água doce no Brasil**. 2. ed. Santa Maria, Ed. UFSM, 608 p. 2013

GULEC, A. K.; DANABAS, D.; URAL, M.; SEKER, E.; ARSLAN, A.; SERDAR, O. Effect of mixed use of thyme and fennel oils on biochemical properties and electrolytes in rainbow trout as a response to *Yersinia ruckeri* infection. **Acta Veterinaria Brno**.v. 82, p 297-302, 2013.

HASHIMOTO, G. S. O.; MARINHO-NETO, F.; RUIZ, M. L.; ACCHILE, M.; CHAGAS, E. S.; CHAVES, F. C. M.; MARTINS, M. L. Essential oils of *Lippia*

sidooides e Mentha piperita against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. **Aquaculture**.v.450, p.182-186, 2016.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; KIM, M. C.; KIM, J. S.; HAN, Y. J.; HEO, M. S. Innate immune response and disease resistance in *Carassius auratus* by triherbal solvent extracts. **Fish & shellfish immunology**, v. 27, n. 3, p. 508-515, 2009.

HARIKRISHNAN, R. S., MOON, Y. G., KIM, M. C., KIM, J. S., DHARANEEDHARAN, , HEO, M. S. Phytotherapy of ulcerative dermatitis induced by *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish (*Carassius auratus*). **Acta Veterinaria Hungarica**.v. 58, n. 1, p. 29-37, 2010.

HERNÁNDEZ, A.; GARCÍA GARCÍA, B.; JORDÁN, M. J.; HERNÁNDEZ, M. D.; Study of the dose of thyme essential oil in feed to prolong the shelf life of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Aquaculture nutrition**. v.21, p.704-709, 2015.

HRUBE, T.C. & SMITH, S.A. Hematology of fish. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G. & JAIN, N.C. (Ed.). **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Blackburg: Wiley-Blackwell. p.1120-5. 1998

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), **Produção Pecuária Municipal 2015**, v. 43, p.1-49, Rio de Janeiro, 2015.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), **Produção Pecuária Municipal 2016**, v. 44, p, 1-51, Rio de Janeiro, 2016.

JERÔNIMO, G. T.; PÁDUA, S. B.; BELO, M. A. A.; CHAGAS, E. C.; TOBOGA, S. R.; MACIEL, P. O.; MARTINS, M. L. *Neoechinorhynchus butnerae*(Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: A pathological approach. **Aquaculture**, v.469, p.124-127, 2017.

JIANG, C.; WU, Z. Q.; LIU, L.; WANG, G. X.; Synergy of herbal ingredients against *Dactylogyrus* spp. in an infected goldfish model for monogenean management. **Aquaculture**.v.433, p.115-118, 2014.

KARAGOUNI, E.; ATHANASSOPOLOU, F.; LYTRA, A.; KOMIS, C.; DOTSIKA, E. Antiparasitic and immunomodulatory effect of innovative treatments against *Myxobolus* sp. Infection in *Diplodus puntazzo*. **Veterinary parasitology**.v.134, p.215-228, 2005.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oil as antimicrobials and antifungals. A review. **Flavor and Fragrance Journal**. v. 27, p. 13-39, 2012.

LEE, J. Y.; GAO, Y. Review of application of garlic, *Allium sativum*, in aquaculture. **Journal of the world aquaculture society**.v.43, n.4, p.447-458, 2012.

LIU, Y. M.; ZHANG, Q. Z.; XU, D. H.; FU, Y. W.; LIN, D. J.; ZHOU, S. Y.; LI, J. P. Antiparasitic efficacy of curcumin from *Curcuma longa* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp. **Veterinary parasitology**, v. 236, p. 128-136, 2017.

LOURENÇO, F. S. O ciclo de vida de *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*)*buttnerae* Golvan, 1956 (Euacanthocephala: Neoechinorhynchidae) parasita de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) da Amazônia brasileira. Dissertação de mestrado INPA, Manaus 2017.

LUVISOTO-SANTOS, R.; ELER, M. N.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; VIEIRA, E. N. O uso de praguicidas nas pisciculturas e pesqueiros situados na bacia do rio Mogi-Guaçu. **Boletim do Instituto de pesca**. São Paulo, v.35, n.3, p.343-358, 2009.

MACIEL, P. O. Efeito do praziquantel sobre as variáveis sanguíneas de *Colossoma macropomum* Cuvier, 2018 (Characidae: Serrasalminae) e sua

eficiência como anti-helmíntico no controle de parasitas monogenóides (Platyhelminthes: Monogenoidea. Manaus, 2009 81p. Dissertação (Biologia de água doce e pesca interior) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

MAJOLO, C. , ROCHA, S. I., CHAGAS, E. C., CHAVES, F. C.; BIZZO, H. R. Chemical composition of *Lippiaspp.* essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture research**. v. 48, p. 2380-2387, 2017.

MALAQUIAS, G.; CREQUEIRA, G. S.; FERREIRA, P. M. P.; PACHECO, A. C. L.; SOUZA, J. M. C.; DEUS, M. S. M.; PERON, A. P. Utilização na medicina popular, potencial terapêutico e toxicidade em nível celular das plantas *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L., e *Mentha piperita* L. (Família Laminaceae). **RevInter Revista intertox de toxicologia, risco ambiental e sociedade**. v.7, n.3, p.50-68, 2014.

MALHEIROS, D. F.; MACIEL, P. O.; VIDEIRA, M. N.; TAVARES-DIAS, M. Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitics effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). **Aquaculture**. v.455, p.81-86, 2016.

MALTA, J. C. Os peixes de um lago de várzea da Amazônia central (Lago Janauacá, Rio Solimões) e suas relações com os crustáceos ectoparasitas (Branchiura: Argulidae). **Acta Amazônica**. v.14,n.3-4, p.355-372, 1984.

MALTA, J. C. O.; GOMES, A. L. S.; ANDRADE, S. M. S.; VARELLA, A. M. B. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechynorhynchus buttnerae*, Golvan, 1956, em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), cultivados na Amazônia central. **Acta Amazônia**, v.31, p.133-143, 2001.

MARTINS, M. L.; SOUZA, V. N.; MORAES, J. R. E.; COSTA, A. J. Comparative evaluation of the susceptibility of cultivated fishes to the natural infection with

mixosporean parasites and tissue changes in the host. **Revista Brasileira de Zoologia.** v.59, n.2, p.263-269, 1999.

MATOS, L. V.; OLIVEIRA, M. I. B.; GOMES, A. L. S.; SILVA, G. S. Morphological and histochemical changes associated with massive infection by *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in the farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Amazon State, Brazil. **Parasitology Research.**v.116, p.1029-1037, 2017.

MATTHEWS, R. A. Ichthyophthirius multifiliis Fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts. **Advances in Parasitology**, v. 59, p. 159-241, 2005.

MELO, L. A. S.; IZEL, A. C. U.; RODRIGUES, F. M. **Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em viveiros de argila/barragens no Estado do Amazonas.** Embrapa Amazonia Ocidental, Manaus, 30p, 2001.

MILITZ, T. A. et al. Efficacy of garlic (*Allium sativum*) extract applied as a therapeutic immersion treatment for *Neobenedenia* sp. management in aquaculture. **Journal of fish diseases**, v. 37, n. 5, p. 451-461, 2014.

MORO, G. V.; REZENDE, F. P.; ALVES, L. A.; HASHIMOTO, D. T.; VARELA, E. S.; TORATI, L. S. Espécies de peixe para piscicultura. In RODRIGUES, A. P. O.; LIMA, A. F.; ALVES, A. L.; ROSA, D. K.; TORATI, L. S.; SANTOS, V. R. V. **Piscicultura de água doce: Multiplicando conhecimentos.** Embrapa, Brasília, p.29-70, 2013.

OLIVEIRA, A. A. B.; MARTINELLI, M. Z.; MOREIRA, M. G. M.; SOARES, Seasonality of energy sources of *Colossoma macropomum* in a floodplain lake in the Amazon Lake Camaleão, Amazonas, Brazil. **Fisheries Management and Ecology.**v.13 p.135-142, 2006.

ÖZCAN, M.; CHALCHAT, J. C. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. **Bulg. Journal of Plant Physiology**. v.30, n.3-4, p.68-73, 2004.

PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M.; EIRAS, J. C. **Parasitologia Peixes de água doce do Brasil**. Maringá, Eduem, 452 p., 2013.

PEREIRA, L. A., WEISS, L. A., BESEN, M. A., & MARENGONI, N. G. Uso de extratos de plantas e suas propriedades profiláticas ou terapêuticas na produção de peixes. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 4, p. 373-380, 2016

PILARSKI, F.; OLIVEIRA, C. A. F., SOUZA, F. P. B. D.; ZANNUZO, F. S. Different β -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. **Fish & shellfish immunology**, v. 70, p. 25-29, 2017.

PILARSKI, F.; VARANDAS, D. N.; VALLADÃO, G. M. R.; **Piscicultura: aspectos relevantes**. Uruguaiana, Fundação Universidade Federal do Pampa, v. 15 415 p. 2016

PUK, K.; GUZ, L. Effects of medical plant extracts on the growth of fish parasite *Spironucleus vortens*. **Medycyna Weterynaryjna**. v. 70, n. 8, p 165-168, 2014

RANZANI-PAIVA, M. J.; PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. **Métodos para análises hematológicas em peixes**. Maringá, Eduem, 2013, 140p.

REVERTER, M.; BONTEMPS, N.; LECCHINI, D.; BANAIGS, B.; SASAL, P. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. **Aquaculture**. v.433, p.50-61, 2014.

ROSNY, H.S.; HOSSAIN, M.; HASAN-UJ-JAMAN; ROY, H. S. AURPA, I. A.; KHONDOKER, S.; BISWAS, C. Dietary supplementation of garlic (*Alium sativum*) to prevent Acanthocephala infection in aquaculture. **International journal of fisheries and aquatic studies**. v.4, n.3, p.188-192, 2016.

SAHU, S.; DAS, B. K.; MISHRA, B. K.; PRADHAN, J.; SARANGI, N. Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 23, n. 1, p. 80-86, 2007.

SANTOS, C. P.; MACHADO, P. M.; SANTOS, E. G. N. Acanthocephala In PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M.; EIRAS, J. C. (Org). **Parasitologia de peixes de água doce do Brasil**. Maringá, Eduem, p.353-370, 2013.

SANTOS, C. P.; GIBSON, D. I.; TAVARES, L. E.; LUQUE, J. L. Checklist of Acanthocephala associated with the fishes of Brazil. **Zootaxa**, v.1938, p.1-22, 2008.

SHELKLE, B.; SNELGROVE, D.; CABLE, J. *In vitro* and *in vivo* efficacy of garlic compounds against *Gyrodactylus turbulli* infecting the guppy (*Poecilia reticulata*). **Veterinary parasitology**. v.198, n.1-2, p.96-101, 2013.

SILVA, R. M.; TAVARES-DIAS, M.; DIAS, M. W. R.; DIAS, M. K. R.; MARINHO, R. G. B. Parasitic fauna in hybrid tambacu from fish farms. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.8, p.1049-1047, 2013.

SILVA-GOMES, A. L.; COELHO-FILHO, J. G.; VIANA-SILVA, W.; BRAGA-OLIVEIRA, M. I.; BERNARDINO, G.; COSTA, J. I. The impact of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Golvan, 1956) (Eoacanthocephala: Neochinorhynchidae) outbreaks on productive and economic performance of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), reared in ponds. **Latin American Journal of Aquatic Research**.v.45, p.496-500, 2017.

SOARES B. V., CARDOSO, A. C. F., CAMPOS, R. R., GONÇALVES, B. B., SANTOS, G. G., CHAVES, F. C. M. TAVARES-DIAS, M. Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia organoides*

(Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, v. 469, p. 72-78, 2017.

SOUZA, C. F.; BALDISSERA, M. D.; VAUCHER, R. A.; LOPES, L. Q. S.; VIZZOTTO, B. S.; RAFFIN, R. P.; SANTOS, R. C. V.; VEIGA, M. L.; ROCHA, M. I. U. M.; STEFANI, L. M.; BALDISSEROTO, B. *In vivo* bactericidal effect of *Melaleuca alternifolia* essential oil against *Pseudomonas hydrophila*: Silver catfish (*Rhamdia quelen*) as an experimental model. **Microbial pathogenesis**.v.98, p.82-87, 2016.

SOUZA, C.F.; BALDISSERA, M. D.; SANTOS, R. C. V.; RAFFIN, R. P.; BALDISSEROTO, B. Nanotechnology improves the therapeutic efficacy of *Melaleuca alternifolia* essential oil in experimentally infected *Rhamdia quelen* with *Pseudomonas aeruginosa*. **Aquaculture**.v.473, p.169-171, 2017.

STEVEDING, D.; MORGAN, E.; TKACZYNSKI, F. W.; TINSLEY, R. Effect of Australian tea tree oil on *Gyrodactylus* spp. Infection of the three spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. **Diseases of aquatic organisms**.v.66, p.29-32, 2005.

TALPUR, A. D. *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass (*Lates calcarifer*) against *Vibrio harveyi* infection. **Aquaculture**.v.420-421, p.71-78, 2014.

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

TAVARES-DIAS, M; MORAES, F. R. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus*Raf), with an assessment of morphologic,

cytochemical, and ultrastructural features. **Veterinary Clinical Pathology**, v.36, n. 1, p. 49-54, 2007.

TAVARES-DIAS, M.; NEVES, L. R.; SANTOS, E. F.; DIAS, M. K; R.; MARINHO, R. G. B.; ONO, E. A. *Perulernaea gamitanae* (Copepoda: Lernaiedae) parasitizing tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Characidae) and the hybrids tambacu and tambatinga, cultured in northern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**.v.63. n.4, p.988-995, 2011.

THOMSEN, P. S.; JENSEN, T. M., HAMMER, K. A., CARSON, C. F., MOLGAARD, P., & RILEY, T. V. . Survey of the antimicrobial activity of commercially available Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil products in vitro. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 17, n. 9, p. 835-841, 2011.

VALLADÃO, G. M. R. Óleos essenciais de plantas na dieta de tilápia-do-Nilo: efeitos sobre a saúde, morfologia intestinal e microbiota. Tese (Doutorado em aquicultura) Centro de aquicultura da Unesp, Jaboticabal, 2018.

VALLADÃO, G. M. R. Potencial de óleos essenciais de plantas para o tratamento de enfermidades em peixes.Dissertação (Mestrado em aquicultura) Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal 2014.

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; IKEFUTI, C. V.; CRUZ, C.; LEVI-PEREIRA, N.; RODRIGUES, M. V. N.; PILARSKI, F. Essential oil to control ichthyophthiriasis in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. **Journal of fish disease**.v.39, n.10, p.1143-1152, 2016.

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, PILARSKI, F. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**.v. 38, p.417-428, 2015.

VENTURA, A. S.; GABRIEL, A. M. A.; SARAVY, T. M.; CAVICHIOLO, F. Descrição histopatológica das lesões intestinais de híbrido patinga parasitado. **Revista de ciência veterinária e saúde pública**. v.4, n.1, p.002-008, 2017.

VIDEIRA, M.; VELASCO, M.; MALCHER, C. S.; SANTOS, P.; MATOS, P.; MATOS, E. An outbreak of mixozoans parasites in farmed fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) in the Amazon region, Brazil. **Aquaculture reports**.v.3, p.31-34, 2016.

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

YILMAZ, S.; ERGÜN, S.; SOYTAZ, N. Herbal supplements are useful to preventing streptococcal disease during first feeding of tilapia fry, *Oreochromis mossambicus*. **The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh**.5 p, 2013.

ZADMAJID, V., & MOHAMMADI, C. H. Dietary thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) changes serum stress markers, enzyme activity, and hematological parameters in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) exposed to silver nanoparticles. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**.v.16, p.1063-1084, 2017.

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