

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP –CAUNESP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE ÓLEOS ESSENCIAIS
CONTRA TRICODINÍDEOS: DESENVOLVIMENTO DE
METODOLOGIA, EFICÁCIA E SEGURIDADE**

Lindomar de Oliveira Alves

Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP –CAUNESP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE ÓLEOS ESSENCIAIS
CONTRA TRICODINÍDEOS: DESENVOLVIMENTO DE
METODOLOGIA, EFICÁCIA E SEGURIDADE**

Lindomar de Oliveira Alves

Orientadora: Dra. Fabiana Pilarski

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

JABOTICABAL – SÃO PAULO

2023

A474a Alves, Lindomar de Oliveira
Atividade antiparasitária de óleos essenciais contra tricodinídeo:
desenvolvimento de metodologia, eficácia e seguridade / Lindomar de
Oliveira Alves. -- Jaboticabal, 2023
xiv, 84 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2023
Orientadora: Fabiana Pilarski
Banca examinadora: Geovana Dotta Tamashiro, Gustavo Moraes
Ramos Valladão, Ricardo Massato Takemoto, Sílvia Umeda Gallani
Bibliografia

1. Antiparasitários. 2. Fitoterapia. 3. Peixes Parasitos. 4. Técnicas in
vitro. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.09

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Espera-se que a tese aqui apresentada sirva como base para o desenvolvimento de pesquisas de antiparasitários a serem empregados em sistemas produtivos. A metodologia para avaliar a efetividade *in vitro* de substâncias com potencial antiparasitário desenvolvida e apresentada na presente tese pode ser utilizada como uma ferramenta para escolha das substâncias mais adequadas antes da realização de testes *in vivo*, facilitando a escolha das substâncias e proporcionando uma redução do número de peixes empregados em estudos *in vivo*. Espera-se também que alerte os pesquisadores e produtores quanto a necessidade de utilização de substâncias seguras para os hospedeiros quando do uso de tratamentos. Por fim, a tese apresenta um objetivo de auxiliar no desenvolvimento de metodologia de tratamentos de peixes afetados com tricodínídeos adotando substâncias com baixo potencial tóxico e poluidor.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

It is expected that the thesis presented here will serve as a foundation for the development of anti-parasitic research to be employed in productive systems. The methodology for evaluating the *in vitro* effectiveness of substances with potential anti-parasitic properties developed and presented in this thesis can be used as a tool for selecting the most suitable substances before conducting *in vivo* tests, facilitating substance selection and reducing the number of fish used in *in vivo* studies. It is also expected to alert researchers and producers to the need for using safe substances for hosts when using treatments. Finally, the thesis aims to assist in the development of treatment methodologies for fish affected by trichodinids by adopting substances with low potential for toxicity and pollution.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Atividade antiparasitária de óleos essenciais contra tricodínídeo: desenvolvimento de metodologia, eficácia e seguridade

AUTOR: LINDOMAR DE OLIVEIRA ALVES

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

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

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI (Participação Virtual)

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

Fabiana Pilarski

Prof. Dr. GUSTAVO MORAES RAMOS VALLADÃO (Participação Virtual)
/ Universidade Nilton Lins, Manaus-AM

gov.br

Documento assinado digitalmente
GUSTAVO MORAES RAMOS VALLADÃO
Data: 06/09/2023 13:08:50-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. RICARDO MASSATO TAKEMOTO (Participação Virtual)

Centro de Ciências Biológicas-Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura / UEM, Maringá-SP

gov.br

Documento assinado digitalmente
RICARDO MASSATO TAKEMOTO
Data: 11/09/2023 10:45:39-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. GEOVANA DOTTA (Participação Virtual)

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal / UFBA, Salvador-BA

Geovana Dotta

Profa. Dra. SÍLVIA UMEDA GALLANI (Participação Virtual)
/ Universidade Nilton Lins, Manaus-AM

gov.br

Documento assinado digitalmente
SÍLVIA UMEDA GALLANI
Data: 06/09/2023 11:33:26-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal, 05 de setembro de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Maria e Aparecido (in memoriam), pelo carinho e por me apoiarem em todas as minhas decisões. À minha mãe, por ser o exemplo que é para mim e meus irmãos; mulher batalhadora e mãe dedicada, que em nenhum momento duvidou da minha capacidade e sempre fez o possível e o impossível para que eu pudesse alcançar meus sonhos.

Ao meu padrasto José Carlos que me apoiou e esteve sempre presente nesta caminhada.

Aos meus irmãos, Ledinalva, Juliano e Josimar, pelo carinho, incentivo e companheirismo em todos os momentos da minha vida.

A minha orientadora Dra. Fabiana Pilarski, por ter dado inúmeras oportunidades desde o período de estágio do curso técnico, durante a graduação e pós-graduação. Por ter confiado e apoiado durante períodos difíceis. Pela amizade, confiança e aprendizado.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da Unesp - LAPOA/Caunesp, pela ajuda na execução do trabalho, companheirismo e aprendizado.

Aos colegas e amigos do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar que sempre me apoiaram e foram uma fonte de inspiração para que pudesse continuar e encerrar esta etapa importante da minha vida.

A Dra. Hírla C. S. Fukushima e Prof. Dr. Ricardo C. Borra pela disponibilização dos animais, ensinamentos e auxílio na realização do teste de embriotoxicidade.

Aos colegas discentes, funcionários e professores do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP).

Aos professores Geovana Dotta Tamashiro, Gustavo M. R. Valladão, Ricardo M. Takemoto, Sílvia U. Gallani, pelas correções e ajuda nas bancas de qualificação e defesa.

Apoio Financeiro

O presente trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Bolsa de Doutorado, Processo nº: 141017/2019-8.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 00.

Sumário

Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução Geral	1
1.1. Panorama geral da piscicultura.....	1
1.2. Tilápia-do Nilo.....	1
1.3. Tricodinídeos.....	2
1.4. Tratamentos de parasitoses na piscicultura.....	3
1.5. Uso de fitoterápicos para tratamento de parasitoses de peixes	4
2. Objetivo	5
2.1. Objetivos específicos	5
MANUSCRITO I	6
Desenvolvimento de metodologia para avaliação da atividade antiparasitária <i>in vitro</i> de óleos essenciais de plantas contra tricodinídeos	6
Resumo.....	6
Abstract	7
1. Introdução.....	8
2. Material e Métodos	9
2.1. Óleos essenciais e composição.....	9
2.2. Atividade <i>in vitro</i> de óleos essenciais contra <i>Trichodina</i> spp.....	10
2.2.1. Obtenção dos parasitos	10
2.2.2. Preparo das soluções	10
2.2.3. Exposição de tricodinídeos aos OEs	11
2.3. Análise Estatística.....	12
3. Resultados.....	12
3.1. Composição dos óleos essenciais	12
3.2 Atividade <i>in vitro</i> de óleos essenciais contra <i>Trichodina</i> spp.....	13
4. Discussão	16
5. Conclusão	20
6. Referências bibliográficas.....	21
MANUSCRITO II	41
Toxicidade de óleos essenciais em peixes e eficácia de óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i> contra tricodinídeos em tilápia-do-Nilo.....	41
Resumo.....	41

Abstract	42
1 Introdução.....	43
2 Material e Métodos	44
2.1 Teste de citotoxicidade.....	44
2.2 Teste de embriotoxicidade.....	46
2.2.1 Obtenção dos embriões de Zebrafish	46
2.2.2 Preparo das soluções testadas.....	47
2.2.3 Procedimento experimental	47
2.3 Atividade <i>in vivo</i> de óleo essencial contra tricodinídeos.....	48
2.4 Análise Estatística:	48
3.1 Citotoxicidade.....	49
3.2 Embriotoxicidade	50
3.3 Eficácia de óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i> contra tricodinídeos.....	55
4 Discussão	55
5 Referências Bibliográficas	59
Referências - Introdução Geral.....	65
CONSIDERAÇÕES FINAIS	70

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Uso de óleos essenciais como controle alternativo de tricodinídeos em tilápia-do-Nilo"**, protocolo nº 5880/23, sob a responsabilidade da Profa. Dra. FABIANA PILARSKI, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 12 de julho 2023.

Vigência do Projeto	10/08/2023 a 31/10/2023
Espécie / Linhagem	Tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)
Nº de animais	26
Peso / Idade	100 – 300 g
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Caunesp

Vigência do Projeto	10/08/2023 a 31/10/2023
Espécie / Linhagem	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)
Nº de animais	550
Peso / Idade	1,5h pós fertilização
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério da Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR

Vigência do Projeto	10/08/2023 a 31/10/2023
Espécie / Linhagem	Tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)
Nº de animais	150
Peso / Idade	1,0
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Caunesp

Jaboticabal, 12 de julho de 2023.



Profa. Dra. Paola Castro Moraes
Vice-coordenadora em exercício – CEUA FCAV

Resumo

Tricodinídeos são parasitos reconhecidos mundialmente por ocasionar perdas na piscicultura, sendo responsáveis por surtos principalmente quando há um desequilíbrio na relação hospedeiro-ambiente-parasito. Para controlar este ectoparasito, muitas vezes são utilizados quimioterápicos com funções antiparasitárias ou desinfetantes, sendo eles registrados ou não para uso na aquicultura. Dessa forma, o uso de fitoterápicos mostra-se como uma importante alternativa para reduzir o uso indiscriminado de produtos químicos e evitar perdas por tricodiníase. Diante dessa situação, o objetivo deste estudo foi prospectar um óleo essencial (OE) eficaz e seguro para o tratamento de tricodinídeos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Inicialmente, foram investigados 13 OEs de plantas para determinar a composição química e atividade antiparasitária *in vitro*. Com os OEs mais promissores foram determinados os efeitos tóxicos no hospedeiro e a eficácia do OE de *Eucalyptus globulus*. Foram identificados 85 compostos entre os 13 OEs. Cinco OEs apresentaram eficácia contra tricodinídeos na menor concentração 60 $\mu\text{L L}^{-1}$ (*Citrus aurantifolia*, *Cupressus sempervirens*, *Eucalyptus globulus*, *Juniperus virginiana* e *Thymus vulgaris*), sendo então analisados quanto à citotoxicidade resultando em baixos percentuais de lise dos eritrócitos. Na análise de embriotoxicidade apenas o óleo essencial de *E. globulus* não apresentou toxicidade em nenhuma das doses testadas e efeito teratogênico leve foi observado apenas na maior concentração testada (200 mg L^{-1}). *E. globulus* apresentou uma redução na carga parasitária de juvenis de tilápia-do-Nilo independente da dose testada, alcançando efetividade entre 68,3-73,9%. Os resultados desse estudo evidenciam o potencial de uso de óleos essenciais no controle da tricodiníase em tilápia-do-Nilo

Palavras-chave: antiparasitários, fitoterapia, peixes parasitos, técnicas *in vitro*.

Abstract

Trichodinids are globally recognized parasites causing losses in aquaculture, often leading to outbreaks, especially when there is an imbalance in the host-environment-parasite relationship. To control this ectoparasite, chemotherapeutic agents with antiparasitic functions or disinfectants are often used, whether registered for use in aquaculture or not. Thus, the use of phytotherapeutics emerges as an important alternative to reduce the indiscriminate use of chemical products and prevent losses due to trichodiniasis. Given this situation, the objective of this study was to prospect an effective and safe essential oil (EO) for the treatment of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) trichodinids. Initially, 13 plant EOs were investigated to determine their chemical composition and in vitro antiparasitic activity. With the most promising EOs, toxic effects on the host and the efficacy of *Eucalyptus globulus* EO were determined. Eighty-five compounds were identified among the 13 EOs. Five EOs showed efficacy against trichodinids at the lowest concentration of 60 $\mu\text{l.l}^{-1}$ (*Citrus aurantifolia*, *Cupressus sempervirens*, *Eucalyptus globulus*, *Juniperus virginiana*, and *Thymus vulgaris*), which were then analyzed for cytotoxicity, resulting in low percentages of erythrocyte lysis. In embryotoxicity analysis, only the essential oil of *E. globulus* showed no toxicity at any of the tested doses, and mild teratogenic effects were observed only at the highest tested concentration (200 mg.l^{-1}). *E. globulus* demonstrated a reduction in trichodinid load in juvenile Nile tilapia regardless of the tested dose, achieving effectiveness between 68.3-73.9%. The results of this study highlight the potential use of essential oils in controlling trichodiniasis in Nile tilapia.

Keywords: antiparasitics, phytotherapy, fish parasites, in vitro techniques.

1. Introdução Geral

1.1. Panorama geral da piscicultura

A aquicultura tem aumentado significativamente nos últimos anos no Brasil, com produção atingindo um valor anual de 6,93 bilhões de reais em 2021 (IBGE, 2022). Com o aumento da demanda mundial por proteína de peixe e a estagnação da atividade de pesca extrativista, que se mantém estável desde a década de 1990 (FAO, 2014), a aquicultura tornou-se uma alternativa viável para suprir a demanda de peixes, registrando taxa de crescimento de 13,4% nas últimas três décadas (Tavares-Dias; Martins, 2017).

A grande variação climática e a disponibilidade de recursos entre as regiões brasileiras facilitam a produção de diferentes espécies de peixes em variadas condições de produção. Segundo o Anuário Brasileiro da Piscicultura (2023), publicado pela Associação Brasileira de Piscicultura (Peixe BR), o volume de peixes produzidos no país alcançou 860,3 mil toneladas, 2,3% a mais que as 841 mil toneladas em 2021. A tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* é a principal espécie de peixe produzida no Brasil, sendo responsável por 63,93% do total produzido com 550,0 mil toneladas. Com um aumento de 3,0% da produção em relação a 2021, a tilápia-do-Nilo é produzida em praticamente todas as regiões do país, sendo os estados do Paraná (187.800 toneladas), São Paulo (77.300 toneladas) e Minas Gerais (51.700 toneladas) os maiores produtores atualmente (PEIXEBR, 2023).

1.2. Tilápia-do Nilo

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie altamente difundida e apresenta um grande papel econômico no mercado aquícola mundial, contribuindo tanto na renda de pequenos produtores, bem como sendo explorada comercialmente por grandes empresas, sendo produzida de forma intensiva em altas densidades com alta tecnologia, comercializada no mercado internacional em grande escala (Fitzsimmons; Martinez-Garcia; Gonzalez-Alanis, 2011; Furuya et al., 2008). A *O. niloticus* é a terceira espécie mais produzida em água doce no mundo, com produção superior a 4,4 milhões de toneladas em 2020, representando 9% do total de peixes produzido no mundo (FAO, 2022).

Este ciclídeo originário da bacia do rio Nilo, no Leste da África, é uma espécie de água doce com hábito alimentar onívoro, com alta plasticidade, encontrando-se distribuída em diversas regiões tropicais e subtropicais (Carvalho, 2006). Por apresentar diversas características favoráveis à criação, como a resistência ao manejo, crescimento acelerado, boa eficiência alimentar, suportar ampla variação de temperatura, salinidade e pH, tolerar baixos teores de oxigênio além de apresentar resistência a diversas enfermidades (Boscolo; Hayashi; Meurer, 2002; Zimmermann; Fitzsimmons, 2004) a tilápia é adotada como principal espécie produzida no Brasil, adotando-se sistemas produtivos mais intensivos em altas densidades de estocagem que pode favorecer o surgimento de enfermidades.

Neste contexto, por possuir um grande destaque na produção nacional e grande importância no mercado internacional, diversas pesquisas relacionadas às enfermidades que acometem a tilápia-do-Nilo, bem como alternativas de tratamento e prevenção são de extrema importância para aprimorar a produção.

1.3. Tricodinídeos

As parasitoses se destacam como uma das principais enfermidades em sistemas produtivos. Uma grande variedade de organismos pode afetar a tilápia-do-Nilo, estabelecendo interação que ocasiona prejuízo a este hospedeiro, sendo a grande maioria ectoparasitos como protozoários e platelmintos.

Os protozoários ciliados parasitam tanto o tegumento quanto brânquias (Martins et al., 2015), sendo os tricodinídeos um dos principais grupos de ectoparasitos relatados na piscicultura. Os tricodinídeos apresentam comportamento de ectocomensais quando a intensidade de infestação é baixa em hospedeiros selvagens, sem que o hospedeiro seja prejudicado (Eiras et al., 2010). Entretanto, em sistemas de produção intensivo em que há adoção de altas densidades, manejo intenso, elevados níveis de arraçoamento, entre outros fatores estressantes, pode haver um desequilíbrio na relação hospedeiro:ambiente:parasito gerando infestações parasitárias massivas, acarretando infecção primária e/ou enfermidades oportunistas, como bacterianas ou fúngicas, causando lesões e mortalidade nos peixes (Abd El-Galil; Aboelhadid, 2012; Khan, 2009;).

Este grupo de protozoários ciliados engloba os gêneros *Trichodina*, *Paratrichodina*, *Tripartiella*, *Dipartiella*, *Vauchomia*, *Hemitrichodina* e *Trichodinella* (Qin et al., 2023). Tricodinídeos são encontrados facilmente em ambientes aquáticos podendo estabelecer relações com diversos organismos vertebrados e invertebrados. Em peixes, o mecanismo de ação relacionado à patogenia ocorre quanto a forma como infectam os hospedeiros, pois geralmente se fixam no hospedeiro com a membrana aboral criando um movimento de sucção na superfície epitelial causando irritação nos tecidos (Basson; Van As, 2006). Em peixes, no início do desenvolvimento em que as estruturas de proteção como escamas não estão totalmente desenvolvidas, as lesões ocasionadas pelo movimento circular dos tricodinídeos na superfície epitelial tornam-se mais graves quando comparados com peixes adultos (Valladão; Alves; Pilarski, 2016), assim regiões como as brânquias também podem apresentar lesões mais severas ocasionando mortalidades.

1.4. Tratamentos de parasitoses na piscicultura

A abordagem mais eficaz para reduzir perdas por enfermidades infecciosas é evitar a introdução de agentes patogênicos no ambiente de criação, bem como evitar a sua multiplicação. Nesse contexto, a adoção de boas práticas de manejo é essencial para manter um ambiente adequado e assegurar o bem-estar animal (Boison; Turnipseed, 2015). Entretanto, depois de instaladas nos peixes, as parasitoses devem ser controladas com esforços financeiros e de manejo relacionados principalmente com mão de obra especializada e insumos (Tavechio; Guidelli; Portz, 2009).

Diversos produtores têm feito uso de produtos químicos altamente tóxicos, inclusive não registrados para o tratamento de doenças em peixes (Valladão; Gallani; Pilarski, 2015). A maioria das parasitoses de peixes são controladas com produtos químicos como formalina, sulfato de cobre, verde de malaquita, cloramina, pesticidas organofosforados e diflubenzuron. Esses produtos podem apresentar efeitos tóxicos nos peixes, afetando principalmente as brânquias, tegumento e fígado, além do acúmulo de resíduos na musculatura, que oferece risco ao consumidor quando não respeitado o período de carência pós tratamento (Tavechio; Guidelli; Portz, 2009).

O uso intensivo de produtos químicos na aquicultura apresenta numerosas desvantagens, tanto para o meio ambiente quanto para a saúde (Reverter et al., 2017). Assim como verificado para bactérias, o uso de drogas antiparasitárias como triclorfon em tratamentos de banhos podem resultar no desenvolvimento de resistência (Umeda et al., 2006), podem afetar organismos não alvos (Valladão; Gallani; Pilarski, 2015), além de serem eliminados no efluente para o ambiente (Rico; Van Den Brink, 2014). Devido a esses fatores a busca por tratamentos alternativos com substâncias menos nocivas é estimulada.

1.5. Uso de fitoterápicos para tratamento de parasitoses de peixes

Diversas moléculas de óleos essenciais e extratos botânicos estão sendo estudadas e desenvolvidas como alternativa ao uso de produtos químicos que oferecem riscos à saúde dos peixes, meio ambiente e humanos. Neste sentido, o emprego dos fitoterápicos na piscicultura pode contribuir com a redução do uso de quimioterápicos, possibilitando maior sustentabilidade à produção de peixes, permitindo o tratamento de doenças em lotes de peixes, evitando mortalidades e perdas econômicas, com redução dos riscos ambientais (Valladão; Gallani; Pilarski, 2015).

Fitoterápicos são definidos como plantas ou extratos, podendo ser comercializados em comprimidos, cápsulas, pós, chás, extratos e plantas frescas ou secas (Zhu, 2020). Diversos benefícios são obtidos com a sua utilização como atividade antibacteriana, antiestresse, anti-helmíntica e antiprotozoária em peixes, decorrentes de princípios ativos constituintes como alcalóides, flavonoídes, compostos fenólicos, terpenoides e esteroides (Dawood et al., 2021; Reverter et al., 2014; Tavares-Dias, 2018; Zhu, 2020). Apesar dos diversos benefícios verificados com o uso de fitoterápicos, seu uso é desafiador em razão das diversas situações de criação, estágios de desenvolvimento dos peixes e fases de vida dos parasitos, podendo influenciar na eficácia do tratamento bem como na toxicidade aos peixes (Tavechio; Guidelli; Portz, 2009; Zhu, 2020).

Na aquicultura, diversos são os fitoterápicos estudados como antiparasitários para o controle de helmintos ou protozoários como *Allium sativum* (Salaro, 2018), *Copaifera duckei* (Costa et al., 2017), *Hyptis mutabilis* (Cunha et al., 2017), *Lavandula angustifolia* (Valladão et al., 2016), *Lippia alba* (Costa et al., 2017).

2020; Salaro, 2018), *Lippia sidoides* (Hashimoto et al., 2016), *Melaleuca alternifolia* (Salaro, 2018; Valladão et al., 2016), *Mentha piperita* (Costa et al., 2020; Hashimoto et al., 2016; Malheiros et al., 2016; Salaro, 2018; Valladão et al., 2016), *Oncimum basilicum* (Salaro, 2018), *Oncimum gratissimum* (Meneses et al., 2018), *Pterodon emarginatus* (Valentim et al., 2018), *Thymus vulgaris* (Salaro, 2018), *Varronia curassavica* (Nizio et al., 2018) e *Zingiber officinale* (Costa et al., 2020; Fu et al., 2017; Salaro, 2018). Apesar do grande número de estudos sobre os efeitos antiparasitários de fitoterápicos na aquicultura há um número restrito de publicações em que o parasito foco do estudo pertença ao grupo dos tricodinídeos.

Diante da presente situação, este trabalho teve como objetivos:

2. Objetivo

Avaliar a eficácia e seguridade de óleos essenciais de plantas contra tricodinídeos de tilápia-do-Nilo.

2.1. Objetivos específicos

- Desenvolver metodologia para avaliação *in vitro* de atividade antiparasitária de compostos contra tricodinídeos;
- Avaliar o efeito antiparasitário *in vitro* de 13 óleos essenciais em tricodinídeos;
- Determinar a composição química dos óleos essenciais utilizados no teste *in vitro*;
- Avaliar o efeito citotóxico em eritrócitos de tilápia-do-Nilo dos cinco óleos essenciais com melhores resultados no teste *in vitro*;
- Avaliar efeito embriotóxico em Zebrafish dos quatro óleos com menor citotoxicidade;
- Avaliar a eficácia no controle de tricodinídeos em juvenis de tilápia-do-Nilo do óleo essencial com menor embriotoxicidade.

MANUSCRITO I¹

Desenvolvimento de metodologia para avaliação da atividade antiparasitária *in vitro* de óleos essenciais de plantas contra tricodinídeos

Resumo

O uso de óleos essenciais (OEs) é uma importante estratégia para reduzir o uso de quimioterápicos na aquicultura devido a efeitos antibacterianos, antiparasitários, imunoestimulantes e promotor de crescimento. Neste trabalho desenvolvemos metodologia para a avaliação da atividade antiparasitária (ensaio *in vitro*) de 13 OEs contra tricodinídeos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), bem como determinar a composição dos mesmos. A composição dos OEs foi determinada por cromatografia gasosa, a citotoxicidade através da hemólise de eritrócitos e a atividade antiparasitária pela exposição dos tricodinídeos aos compostos por um período de 3 h em placas de Kline. Um total de 85 componentes foram identificados nos OEs, sendo a maioria classificados como monoterpenos oxigenados. *Citrus aurantifolia*, *Cupressus sempervirens*, *Eucalyptus globulus*, *Juniperus virginiana* e *Thymus vulgaris* foram os mais efetivos no controle de tricodinídeos na menor dose testada (60 µl.l⁻¹). Este estudo fornece informações fundamentais para o aprimoramento de tratamentos de protozoários de peixes utilizando OEs.

Palavras-chave: antiparasitários, fitoterápicos, parasitos, tratamento

¹ Artigo escrito nas normas da revista Aquaculture

Development of a methodology for evaluating the *in vitro* antiparasitic activity of plant essential oils against trichodinids

Abstract

The use of essential oils (EOs) is an important strategy to reduce the use of chemotherapy drugs in aquaculture due to their antibacterial, antiparasitic, immunostimulant and growth-promoting effects. In this work we developed a methodology for evaluating the antiparasitic activity (*in vitro* assay) of 13 EOs against trichodinids from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), as well as determining their composition. The composition of the EOs was determined by gas chromatography, the cytotoxicity through erythrocyte hemolysis and the antiparasitic activity by exposing the trichodinids to the compounds for a period of 3 h in Kline plates. A total of 85 components were identified in EOs, the majority of which were classified as oxygenated monoterpenes. *Citrus aurantifolia*, *Cupressus sempervirens*, *Eucalyptus globulus*, *Juniperus virginiana* and *Thymus vulgaris* were the most effective in controlling trichodinids at the lowest dose tested (60 $\mu\text{L.l}^{-1}$). This study provides fundamental information for improving treatments of fish protozoa using EOs.

Keywords: antiparasitic, herbal, parasites, treatment

1. Introdução

Atualmente, a maioria das espécies de peixes de interesse comercial são produzidas de forma intensiva. Nesta forma de produção há a necessidade de um constante acompanhamento das condições ambientais, nutricionais e sanitárias para evitar grandes perdas por doenças. A tricodiníase é uma parasitose causada por protozoários ciliados que em grandes infestações causam lesões significativas nos peixes. Sua proliferação é acentuada na presença de material em decomposição e temperaturas elevadas (Marchiori e Martins, 2012).

As principais lesões causadas pelos tricodinídeos são hiperplasia e hipertrofia do epitélio lamelar (Abdelkhalek et al., 2018), necrose de tecido branquial (Khallaf et al., 2020) e áreas de sucção na superfície corporal (Valladão et al., 2014; 2016a) que podem culminar na morte dos hospedeiros. Para evitar grandes perdas por parasitismo, é comum o uso de antiparasitários e desinfetantes como formalina, permanganato de potássio, sulfato de cobre, paration, ivermectina e diflubenzuron. Apesar da eficácia desses produtos, o uso incorreto pode ocasionar problemas como a seleção de organismos resistentes, agressão ao meio ambiente e ao homem devido ao acúmulo de resíduos químicos (Tavares-Dias, 2018).

Devido a essas condições, o estudo de fitoterápicos como alternativa para tratamentos de enfermidades na piscicultura vem aumentando nos últimos anos. Dentre os fitoterápicos, destacam-se os óleos essenciais (OEs) que são biodegradáveis e, devido à grande variedade de componentes químicos, são menos propensos a ocasionar bioacumulação propiciando a seleção de organismos resistentes (Kulkarni et al., 2013).

Para que um OE seja adotado como tratamento de alguma enfermidade, diversas análises são necessárias como a validação com testes *in vitro* permitindo o reconhecimento da existência de propriedades antiparasitárias do OE que está sendo estudado e ao mesmo tempo é necessária a realização da caracterização para identificar os compostos bioativos presentes (Tavares-Dias, 2018). Apesar da importância dos testes *in vitro* para avaliar a atividade antiparasitária dos compostos, poucos são os relatos deste tipo de estudo com tricodinídeos.

O número de estudos *in vitro* envolvendo tricodinídeos é reduzido. Couto et al. (2014) avaliaram o efeito de *Oncimum gratissimum* contra tricodinídeos de tilápia-do-Nilo, enquanto Marzouk et al. (2018) testaram a eficácia de Vaccium210® contra estes protozoários em *Sparus aurata*. Estudos *in vitro* com estes parasitos apresentam dificuldade de realização devido o tempo reduzido de sobrevivência fora do hospedeiro, a mobilidade elevada que os parasitos apresentam e a grande capacidade de aderência nas extremidades ou paredes dos recipientes comumente utilizados para este tipo de estudo.

Diante dessa situação, o presente estudo teve como objetivo investigar a composição química, padronizar as condições para o estudo *in vitro* e avaliar os efeitos antiparasitários de 13 OEs de diferentes plantas contra tricodinídeos de tilápia-do-Nilo nas condições estabelecidas.

2. Material e Métodos

Todos os procedimentos adotados no estudo estão de acordo com as normas dos princípios éticos em pesquisa animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal, os quais foram aprovados sob o protocolo nº 5880/23.

2.1. Óleos essenciais e composição

Treze OEs extraídos de plantas e formol foram utilizados para o estudo (Tabela 1). Os OEs utilizados foram adquiridos da empresa Phytoterapica® e estocados nos frascos originais, fechados e protegidos de luz a 4-8°C até serem usados nos testes e analisados. O formol utilizado foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich® e armazenado conforme as instruções do fabricante.

A composição dos OEs foi determinada por análise de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama usando equipamento Agilent HP 7820A e confirmada através de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa usando o equipamento Shimadzu QP2010 ULTRA, conforme descrito por Valladão et al., (2019).

2.2. Atividade *in vitro* de óleos essenciais contra *Trichodina* spp.

2.2.1. Obtenção dos parasitos

Para o estudo, tilápias infestadas naturalmente com tricodinídeos foram capturadas e tiveram a superfície corporal raspada com lâmina para microscopia. O conteúdo de muco contendo os parasitos foi acondicionado em frasco coletor de 80ml e acrescido com água do tanque em que os peixes estavam sendo mantidos até atingir o volume de 50 ml e homogeneizado suavemente.

Para retirar o excesso de muco, o conteúdo foi deixado em repouso por 5 minutos para a decantação, e em seguida, o sobrenadante que contem grande parte dos tricodinídeos vivos foi pipetado em outro frasco coletor e adicionado água do tanque de criação dos peixes para a diluição dos parasitos a 360 parasitos por mililitro. A quantificação inicial dos tricodinídeos da solução foi realizada em câmara de Sedgewick Rafter sob microscopia óptica. Esta etapa foi extremamente importante para que os parasitos não morressem devido ao excesso de muco conforme verificado em teste piloto.

2.2.2. Preparo das soluções

As soluções estoques (10ml) foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma-Aldrich®) e água deionizada. Devido a características de solubilidade de alguns OEs, após teste visual, foi determinado o uso de volume de DMSO correspondente a 6x o volume de OE em todas as concentrações para garantir a homogeneidade da solução. As soluções estoques foram preparadas logo antes dos teste para evitar alterações na composição, sendo preparadas soluções estoques contendo 480 μ l.l⁻¹, 960 μ l.l⁻¹, 1920 μ l.l⁻¹ e 3840 μ l.l⁻¹ de OE e 2880 μ l.l⁻¹, 5760 μ l.l⁻¹, 11520 μ l.l⁻¹ e 23040 μ l.l⁻¹ de DMSO respectivamente.

Além das soluções contendo OE e DMSO como solubilizante, também foram preparadas soluções de formol (Sigma-Aldrich®) nas concentrações de 480 μ l.l⁻¹, 960 μ l.l⁻¹, 1920 μ l.l⁻¹ e 3840 μ l.l⁻¹ para serem utilizadas como controles positivos. Como controles negativos foram preparadas soluções contendo apenas DMSO nas concentrações de 2880 μ l.l⁻¹, 5760 μ l.l⁻¹, 11520 μ l.l⁻¹ e 23040 μ l.l⁻¹.

2.2.3. Exposição de tricodínídeos aos OEs

Com o auxílio de uma micropipeta, 70 µl da água contendo os tricodínídeos ($360 \text{ parasitos.ml}^{-1}$) foram pipetados nos 12 poços da placa de Kline, sendo 10 poços destinados ao teste com as substâncias e 2 poços de controle de placa.

Diversas placas foram utilizadas, sendo necessários 208 poços para os 13 OE em quatro concentrações com quatro repetições cada dose, enquanto 32 poços foram utilizados para os dois controles (positivo com formol e negativo com DMSO) também em quatro concentrações com quatro repetições cada.

Uma visualização inicial dos tricodínídeos foi realizada em todos os poços para verificar a presença de parasitos mortos antes do início do teste, bem como verificar a distribuição dos mesmos. Posteriormente, 10 µl de cada solução estoque foram adicionadas em seus respectivos poços completando um volume de 80 µl, dessa forma, os tricodínídeos foram expostos às concentrações de 60 µl.l^{-1} , 120 µl.l^{-1} , 240 µl.l^{-1} e 480 µl.l^{-1} de OE ou formol enquanto as concentrações finais de DMSO foram: 360 µl.l^{-1} , 720 µl.l^{-1} , 1440 µl.l^{-1} e 2880 µl.l^{-1} . Para evitar a evaporação do conteúdo durante a realização do teste, as placas de Klein foram vedadas utilizando plástico filme de PVC.

Todos os poços foram analisados a cada 1 hora para a quantificação dos parasitos mortos, sendo 3h de exposição o tempo máximo do estudo. O tempo máximo de exposição foi estabelecido durante testes preliminares em que mais de 80% dos tricodínídeos permaneceram vivos por um período de 4h quando mantidos somente na água do tanque em que o hospedeiro estava. Esta etapa de quantificação foi realizada em microscópio óptico com amplificação de 40x e foram considerados mortos os parasitos que não apresentavam movimentação ciliar ou com membrana rompida.

Devido a característica de grande mobilidade dos parasitos durante o teste, somente os parasitos mortos foram quantificados durante as avaliações, sendo necessária a quantificação do número total de parasitos por poço após o período do teste. Dessa forma, para confirmar o número de parasitos em cada poço, foi adicionado um volume de 10 µl de formol puro ocasionando a morte de todos os

tricodinídeos permitindo a contagem dos mesmos e, estes valores foram considerados como o total de parasitos expostos para o cálculo percentual de mortalidade a cada observação.

As placas em que houve mortalidade de tricodinídeos superior a 20% nos poços de controle de placa (apenas água do tanque) foram desconsideradas e o teste repetido.

2.3. Análise Estatística

Os dados obtidos no teste de atividade antiparasitária foram avaliados utilizando o software estatístico Jamovi® 2.4.11. Devido a característica não paramétrica dos dados, estes foram analisados pelo teste estatístico Log-rank, utilizando a metodologia de comparação por pares. Os valores de p foram corrigidos pela metodologia de Bonferroni e considerado nível de significância de 0,05. Os gráficos de mortalidade foram gerados utilizando o software GraphPad Prism® 9.4.

3. Resultados

3.1. Composição dos óleos essenciais

Na análise de cromatografia gasosa foi possível identificar 85 compostos químicos a partir dos OEs analisados, desses 14 eram monoterpenos hidrocarbonetos, 35 monoterpenos oxigenados, 25 sesquiterpenos hidrocarbonetos e 11 sesquiterpenos oxigenados. A porcentagem de componentes identificados em cada OE variou de 82,7% a 99,9% (Tabela 2). As porcentagens mais baixas (1,7%) e mais altas (89,5%) de monoterpenos hidrocarbonetos foram verificados em OEEC e OECA, respectivamente; enquanto as porcentagens mais baixas (4,5%) e mais altas (96,2%) de monoterpenos oxigenados foram verificadas em OECS e EOEB, respectivamente. Altos percentuais de sesquiterpenos hidrocarbonetos foram verificados em OEEO (90,3%), EOJV (68,1%) e OEAV (20,5), enquanto altos percentuais de sesquiterpenos oxigenados foram verificados apenas em OEJV (27,0%).

Os principais componentes dos OEs identificados e sua maior porcentagem observada foram 1,8-cineol (73,0% dentro do OEEG), acetato de linalila (35,9% dentro do OECT), canfora (17,3% dentro do OEAV), cis-tujopseno (26,9% dentro do OEJV), citronelal (64,4% dentro do OEEC), estragol (77,4% dentro do OEOb), geraniol (34,7% dentro do OECN), limoneno (57,6% dentro do OECA), mentol (41,8% dentro do OEMP), terpinen-4-ol (42,3% dentro do OEMA), timol (53,3% dentro do OETV), α -pineno (52,5% dentro do OECS) e β -cariofileno (55,8% dentro do OECo). Os componentes identificados mais predominantes foram limoneno, mirceno e β -cariofileno (observados em 9 dos 13 OEs), α -terpineol (observado em 7 dos 13 OEs) e linalol, terpinoleno, α -pineno, β -pineno, p-cimeno e γ -terpineno (observados em 6 dos 13 OEs).

3.2 Atividade *in vitro* de óleos essenciais contra *Trichodina* spp.

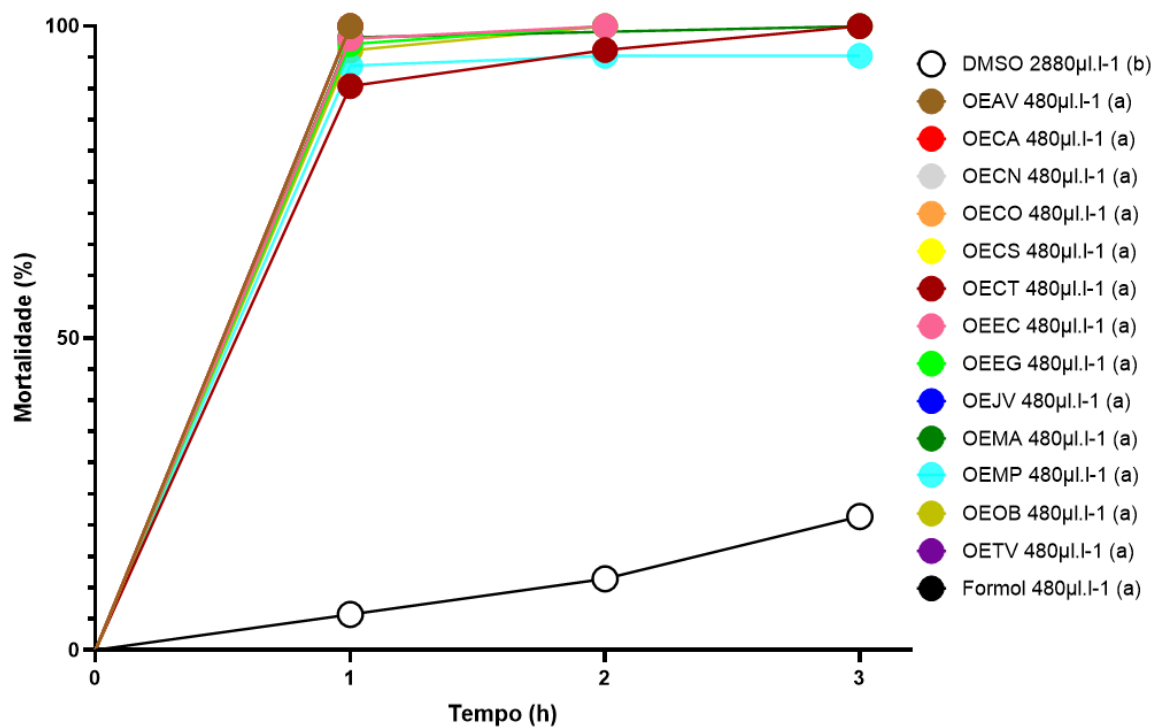
Em todas as doses testadas foi observada a mortalidade de 100% dos tricodinídeos após o período de três horas de exposição ao controle positivo (formol) enquanto nos testes com DMSO foi observada níveis reduzidos de mortalidade, sendo o maior percentual de mortalidade observada na dose de 2880 $\mu\text{L.l}^{-1}$ com um total de 21,05% de tricodinídeos mortos após as três horas (Figura 1).

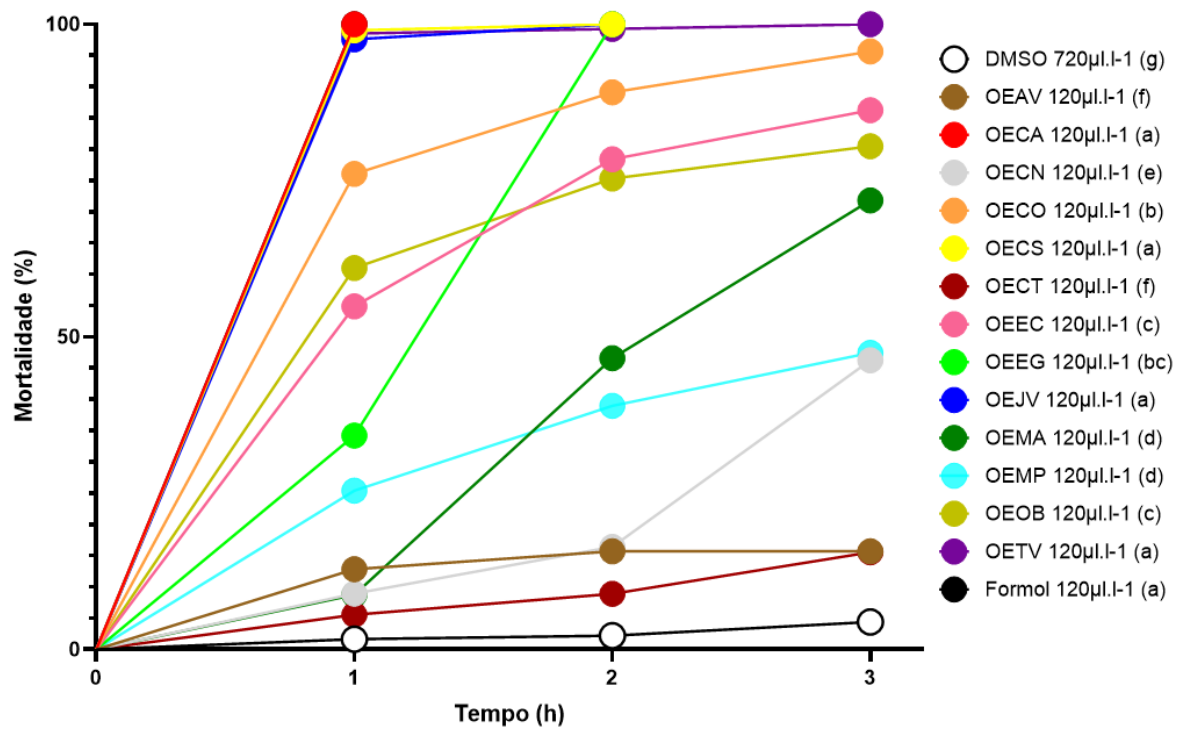
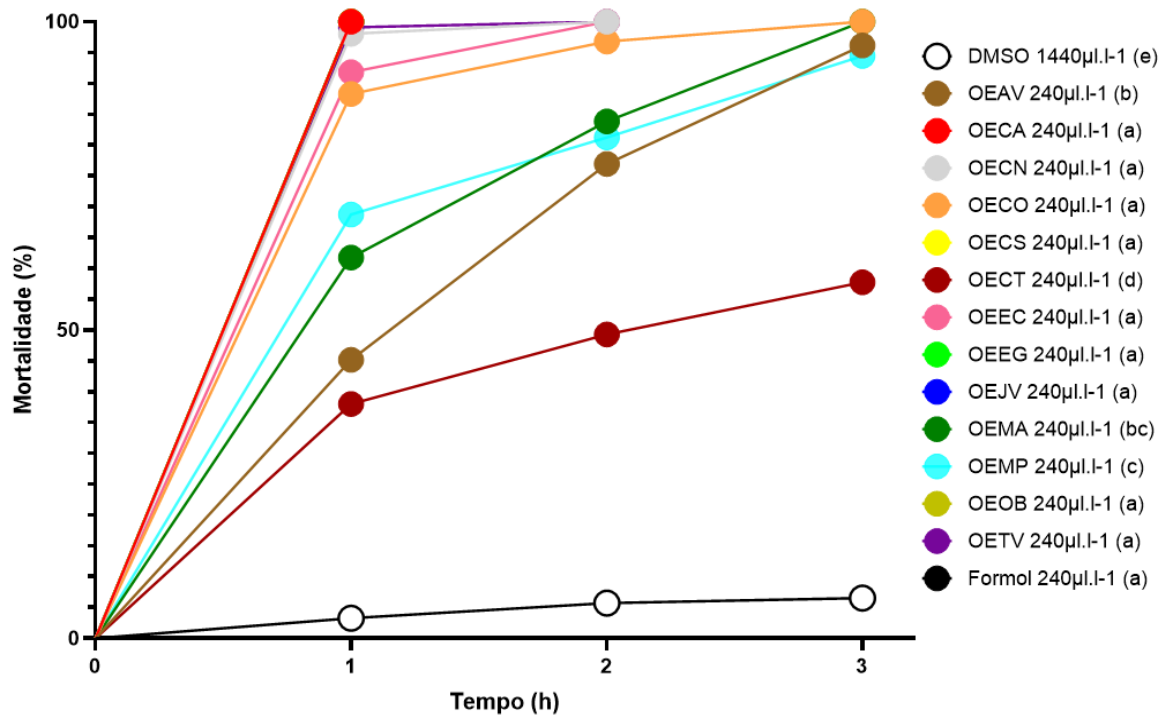
Todos os OEs testados ocasionaram a mortalidade de 100% dos tricodinídeos nas doses de 480 $\mu\text{L.l}^{-1}$. Na dose de 240 $\mu\text{L.l}^{-1}$ foi possível verificar uma menor efetividade de OECT, OEAV, OEMA e OEMP no controle deste parasito em tempos reduzidos. Mesmo com o aumento da efetividade com o avançar do tempo, a mortalidade dos tricodinídeos por um período de três horas manteve-se menor do que os demais OEs testados.

Com a redução da concentração para 120 $\mu\text{L.l}^{-1}$ foi possível verificar melhor a diferença entre os OEs testados. Níveis de mortalidade superior a 80% foram verificados nos tratamentos com OECA, OECo, OECS, OEEC, OEEG, OEJV, OEOb e OETV. Os menores níveis de mortalidade após decorridas três horas de exposição foram observados nos tratamentos com OEAV e OECT, ocasionando morte de apenas 15,11% e 15,77% dos parasitos, respectivamente.

Baixos níveis de mortalidade de tricodinídeos foram observados nos tratamentos com OEAV (14,65%), OECT (13,97%), OEMA (19,36%) e OEMP

(17,60%) na dose de $60 \mu\text{L.l}^{-1}$ com três horas de exposição. Ao reduzir a dose para $60 \mu\text{L.l}^{-1}$ foi possível observar melhor a dependência do tempo de duração da exposição com as taxas de mortalidades. Com uma hora de exposição foi possível observar taxas de mortalidade de parasitos nos tratamentos com OECA e OECS acima do controle positivo (formol), podendo ser um indicativo de maior eficiência destes OEs em tratamentos de tricodínídeos. Após três horas de exposição apenas cinco dos óleos testados apresentaram níveis de mortalidade superior a 75%, sendo eles: OECA, OECS, OEEG, OEJV e OETV.





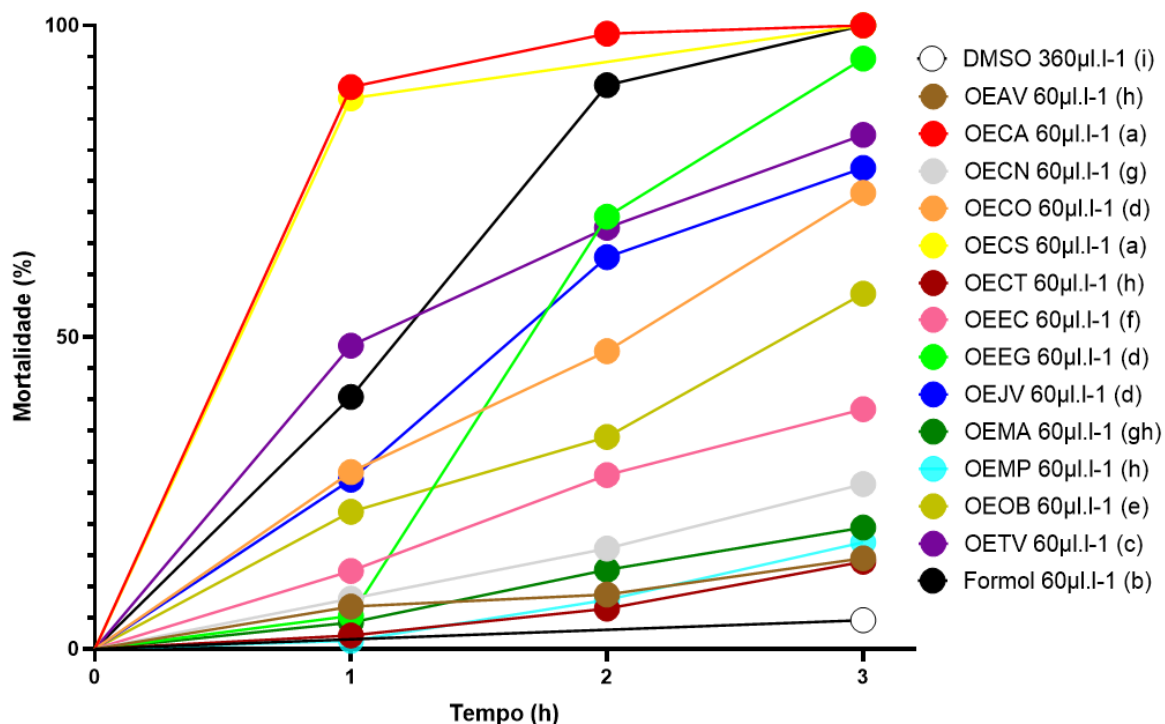


Figura 1. Efeito antiparasitário de 13 óleos essenciais (*Artemisia vulgaris*-OEAV, *Citrus aurantifolia*-OECA, *Cymbopogon nardus*-OECN, *Copaifera officinalis*-OEEO, *Cupressus sempervirens*-OECS, *Citrus aurantium*-OECT, *Eucalyptus citriodora*-OEEC, *Eucalyptus globulus*-OEEG, *Juniperus virginiana*-OEJV, *Melaleuca alternifolia*-OEMA, *Mentha piperita*-OEMP, *Oncium basilicum*-OEEOB e *Thymus vulgaris*-OETV) contra tricodínídeos em diferentes doses (60, 120, 240 e 480 μl.l⁻¹) e tempos (1, 2 e 3h) de exposição. Letras minúsculas diferentes indicam diferença nos níveis de mortalidade ($p < 0,05$).

4. Discussão

Estudos de atividades antiparasitárias de compostos contra tricodínídeos geralmente são realizados *in vivo* (Abd El Galil e Aboelhadid, 2012; El Deen e Razin, 2010; Aly et al., 2020; Valladão et al., 2016a; Naas et al., 2024), necessitando nesse caso da exposição dos hospedeiros aos compostos. Dessa forma, tornando-se uma análise em que poucos compostos e doses são testados concomitantemente, elevando os custos pela necessidade de uma estrutura mais robusta, ser necessário um tempo maior para a obtenção de resultados e aumentando o número de animais usados, características que podem ser evitadas com a utilização dos testes *in vitro* (Tavares-Dias, 2018).

Relatos da utilização de testes *in vitro* para avaliar atividade antiparasitária contra tricodínídeos são escassos. Couto et al (2014) avaliaram o efeito *in vitro* do

OE de *Oncimum gratissimum* contra tricodinídeos usando lamelas branquiais parasitadas para a realização do teste, mostrando a capacidade de utilização deste tipo de experimento para selecionar compostos antes da utilização em testes *in vivo*. Marzouk et al. (2018) também demonstraram a capacidade da observação de efeitos antiparasitários de uma preparação comercial de extratos vegetais (Vaccium210) contra tricodinídeos utilizando teste *in vitro* com curto período de exposição (1h). Neste teste foram empregadas placas de 96 poços e fundo chato que dificultam a observação dos parasitos.

Diversas são as metodologias utilizadas para a avaliação *in vitro* de parasitocidas contra protozoários em peixes. A maioria dos trabalhos disponíveis na literatura são testados contra *Ichthyophthirius multifiliis* e adotam diversos tipos de recipientes para o estudo que apresentam parede reta como microplacas de 24 poços (Xu et al., 2016; Ji-Hong et al., 2017; Huang et al., 2022) e microplacas de 96 poços (Valladão et al., 2016b; Xu et al., 2016; Alavinia et al., 2018, Huang et al., 2022).

Devido à grande capacidade de fixação dos tricodinídeos a superfícies verticais, a utilização de placas de petri, microplacas de cultivo ou titulação (6, 12, 24 e 96 poços) independentemente do tipo de fundo, dificultam a realização do teste por permitir a fixação dos mesmos na parede do recipiente onde permanecem mesmo após a morte, impossibilitando a quantificação dos parasitos sob microscopia óptica ou estereomicroscópio. Desta forma, recipientes que apresentam as paredes menos verticalizadas como lâminas escavadas e placa de Kline permitem uma melhor visualização e análise dos parasitos mesmo que não estejam no fundo dos poços.

Entretanto, apesar da observação dos parasitos ser facilitada em recipientes com paredes menos verticalizadas, a alta mobilidade dos tricodinídeos quando em suspensão dificulta a quantificação de indivíduos na realização do teste. Nesta situação é necessária a quantificação apenas dos protozoários mortos, sendo verificada pela ausência de deslocamento na solução, ausência de movimentos ciliares e rompimento da membrana celular permanecendo o disco adesivo com no fundo dos poços. Ao final do período de exposição, os parasitos que permanecerem vivos deverão ser mortos por algum composto

conhecidamente tóxico aos tricodinídeos e os indivíduos então contados para estimar a atividade parasitária do composto testado.

Como controle positivo e composto para matar os parasitos no final do período de teste foi utilizado o formol. Este composto é utilizado no controle de tricodinídeos em diversas regiões e diversos países, sendo este o único produto químico aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de ectoparasitos de peixes para consumo (Smith e Schwarz, 2019). Aly et al. (2020) comparando a eficácia de formol, permanganato de potássio, azul de metileno e cloreto de sódio no controle de tricodinídeos e monogenéticos, verificaram que o formol na dosagem de 25ppm apresentou melhor eficácia que os demais, além de ser uma dose segura para larvas de tilápia-do-Nilo.

O efeito antiparasitário verificado no estudo *in vitro* demonstrou ser dose/tempo dependentes. Diversos óleos apresentaram atividade contra tricodinídeos, entretanto, OECA, OECS, OEEG, OEJV e OETV destacaram-se apresentando altas taxas de mortalidades dos parasitos na menor dose testada (60ul.l⁻¹), evidenciando um potencial para serem utilizados como substitutos aos quimioterápicos.

Neste estudo foi verificado pouca similaridade na composição dos OEs das diferentes plantas. Segundo Wang et al., (2014) a composição química dos OEs varia de acordo com diversos fatores como as características da planta (clima, cultivares, idade, localização, temperatura e reguladores de crescimento) além da forma de obtenção do produto (parte da planta, secagem, método de extração, condições da destilação e armazenamento).

De acordo com Costa et al. (2020) devido à grande variabilidade que pode ocorrer na composição dos OEs, devemos considerar os seus principais compostos pois os efeitos sinérgicos podem contribuir para melhorar a eficácia antiparasitária. A canfora foi o componente majoritário na composição do OEAV (17,3%) seguido por 1,8-cineol e limoneno (ambos com 14,2%) em contraste com os principais componentes descritos na literatura como 16,76% 1,8-cineol, 11,94% canfora e 9,41% isopulegol verificado por Munda et al. (2019) e 37,45% cariofileno, 16,17% Germacreno-D e 13,66% Humuleno descrito por Malik et al., (2019).

Similaridade com a composição química descrita na literatura foi observada no OECA (Spadaro et al., 2012; Lin, et al., 2019), OEEO (Silva et al., 2019; Lima et al., 2021; Monteschio et al., 2021), OECS (Argui et al., 2021; Akermi et al., 2022), OECN (Pontes et al., 2018; Kaur, et al., 2021), OEEO (Araújo-Filho et al., 2019; Insuan e Chahomchuen, 2020), OEEO (Vieira et al., 2017; Vivekanandhan et al., 2020), OEJV (Zhang, Yao, 2018; Santos et al., 2021), OEEO (Elmi et al., 2019; Borotová et al., 2022), OEEO (Machiane et al., 2018; Rosato et al., 2018), OEEO (Sharafati-Chaleshtori et al., 2018; Tran et al., 2018) e OEEO (Valladão et al., 2019; Galavíková et al., 2021). Enquanto OEEO apresentou como principais constituintes acetato de linanila (35,9%), linalol (16,5%) e Limoneno (13,7%), na literatura são verificados constituintes e proporções diferentes do presente estudo (Zarrad et al., 2015; Nidhi et al., 2020; Badalamenti et al., 2022).

Dentre os OE testados, OECS apresentou alta efetividade contra tricotrídeos em todas as doses analisadas *in vitro* representando um potencial uso do fitoterápico no controle da enfermidade causada por estes protozoários na piscicultura. Diversos trabalhos têm relatado o efeito antimicrobiano apresentado por este OE contra diversas espécies (Boukhris et al., 2012; Selim et al., 2014; Argui et al., 2021; Akermi et al., 2022), entretanto, poucos estudos exploram o seu potencial antiparasitário, sendo o efeito antileishmania descrito por alguns autores (Al-Snafi, 2016; Rguez et al., 2019).

O OECA também ocasionou mortalidade de 100% dos tricotrídeos nas doses testadas evidenciando um potencial efeito antiparasitário. Os benefícios obtidos com o uso de extratos, óleos essenciais e até mesmo partes da planta *Citrus aurantifolia* na aquicultura são descritos por diversos autores, destacando principalmente os efeitos antibacterianos (Ali et al., 2014; Pathirana et al., 2018), no crescimento (Totou et al., 2018) e na saúde dos peixes (Totou et al., 2018; Sadeghi et al., 2021). Pathirana et al. (2018) avaliou a atividade antibacteriana de OECA com composição similar ao presente estudo contra diversas bactérias patogênicas e verificou serem necessárias doses de 0,125 a 1% deste composto como concentração mínima bactericida (MBC), enquanto, no presente estudo atividade antiparasitária foi verificada na dose de 60ul.l⁻¹ (0,006%).

Atividade antibacteriana (Roomiani et al., 2013; Park et al., 2016; Gholipourkanani et al., 2019), efeito anestésico ou sedativo (Silva et al., 2021; Yigit et al., 2022) efeito no crescimento (Ghiassi et al., 2022; Nurudeen et al., 2022) e na saúde dos peixes (Ghiassi et al., 2022; Nurudeen et al., 2022) já foram descritas para OEEG, demonstrando ser um composto com grande potencial devido possibilidade de usos diversos na aquicultura. Por outro lado, poucos são os estudos de OEJV relacionados a aquicultura. Compostos extraídos a partir de plantas do gênero *Juniperus* são relatados apresentando efeitos anti-mosquito, com efeitos larvicida e adulticida (Vourlioti-Arapi et al., 2012; Giatropoulos et al., 2013; Tong e Bloomquist, 2013; Evergetis et al., 2016; Tahghighi et al., 2019; Ersino et al., 2020; Yohana et al., 2022).

Diversos estudos estão disponíveis na literatura sobre o uso de OETV na aquicultura, evidenciando a grande variabilidade dos possíveis usos. Dentre os usos descritos destacam-se atividade antibacteriana (Azad et al., 2014; Kačániová et al., 2017; Tural et al., 2019), antifúngica (Nardoni et al., 2019), antiparasitária (Salaro et al., 2018) anestésica (Azad et al., 2014), efeito na saúde de peixes (Azad et al., 2014; Valladão et al., 2019; Zargar et al., 2019; Ghafarifarsani et al., 2022), efeito no crescimento de peixes (Zargar et al., 2019; Ghafarifarsani et al., 2022) e resistência a infecções bacterianas (Zargar et al., 2019; Ghafarifarsani et al., 2022).

A partir do teste *in vitro* da atividade antiparasitária contra tricodinídeos foi possível selecionar OEs que apresentam potencial uso como antiparasitário dentre um elevado número de óleos, utilizando poucos animais e ainda enriquecendo informações sobre estes componentes na literatura científica. Sendo esta a primeira etapa para o desenvolvimento de tratamento eficiente contra protozoários utilizando estes compostos naturais, devendo ser testados posteriormente, quanto a toxicidade e a eficácia de tratamento *in vivo*.

5. Conclusão

O efeito antiparasitário dos óleos testados contra tricodinídeos demonstrou-se dose/tempo dependentes, sendo que, dentre os 13 óleos essenciais avaliados,

Citrus aurantifolia, *Cupressus sempervirens*, *Eucalyptus globulus*, *Juniperus virginiana* e *Thymus vulgaris* foram os que apresentaram maior efeito antiparasitário contra tricodinídeos no teste *in vitro*, mostrando-se promissores no controle destes protozoários em ambientes de criação sendo uma possível alternativa ao uso dos quimioterápicos utilizados atualmente.

6. Referências bibliográficas

Abd El-Galil, M. A. A., Aboelhadid, S. M., 2012. Trials for the control of trichodinosis and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. Vet. Parasitol., 185(2-4), 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.035>

Abdelkhalek, N. K., El-Adl, M. A., Salama, M. F., Elmishmishy, B., Ali, M. O., El-Ashram, A., Hamed, M. F., Al-Araby, M. A., 2018. Molecular identification of *Trichodina compacta* Van As and Basson, 1989 (Ciliophora: Peritrichia) from cultured *Oreochromis niloticus* in Egypt and its impact on immune responses and tissue pathology. Parasitol. Res., 117, 1907-1914. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5883-x>

Akermi, S., Smaoui, S., Elhadeb, K., Fourati, M., Louhichi, N., Chaari, M., Mtibaa, A. C., Baanannou, A., Masmoudi, S., Mellouli, L., 2022. *Cupressus sempervirens* essential oil: exploring the antibacterial multitarget mechanisms, chemcomputational toxicity prediction, and safety assessment in zebrafish embryos. Molecules, 27(9), 2630. <https://doi.org/10.3390/molecules27092630>

Alavinia, S. J., Mirzargar, S. S., Rahmati-Holasoo, H., Mousavi, H. E., 2018. The *in vitro* and *in vivo* effect of tannic acid on *Ichthyophthirius multifiliis* in zebrafish (*Danio rerio*) to treat ichthyophthiriasis. J. Fish Dis., 41(12), 1793-1802. <https://doi.org/10.1111/jfd.12886>

Ali, M. H., Chowdhury, F. S., Ashrafuzzaman, M., Chowdhury, M. A. N., Haque, M. R., Zinnah, K. M. A., Rahman, M. M., 2014. Identification, pathogenicity, antibiotic and herbal sensitivity of *Edwardsiella tarda* causing fish disease in Bangladesh. Curr. Res. Microbiol. Biotechnol., 2(1), 292-297.

Al-Snafi, A. E., 2016. Medical importance of *Cupressus sempervirens* - A review. IOSR J. Pharm., 6(6), 66-76.

Aly, S., Fathi, M., Youssef, E. M., Mabrok, M., 2020. Trichodinids and monogeneans infestation among Nile tilapia hatcheries in Egypt: prevalence, therapeutic and prophylactic treatments. Aquac. Int., 28, 1459-1471. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00537-w>

Araújo-Filho, J. V. D., Ribeiro, W. L. C., André, W. P. P., Cavalcante, G. S., Rios, T. T., Schwinden, G. M., Rocha, L. O., Macedo, I. T. F., Morais, S. M., Bevilaqua, C. M. L., Oliveira, L. M. B. D., 2019. Anthelmintic activity of *Eucalyptus citriodora* essential oil and its major component, citronellal, on sheep gastrointestinal nematodes. Rev. Bras. Parasitol. Vet., 28, 644-651. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019090>

Argui, H., Youchret-Zalleza, O. B., Suner, S. C., Periz, Ç. D., Türker, G., Ulusoy, S., Ben-Attia, M., Büyükkaya, F., Oral, A., Coskun, Y., Said, H., 2021. Isolation, chemical composition, physicochemical properties, and antibacterial activity of *Cupressus sempervirens* L. essential oil. J. Essent. Oil Bear. Plants, 24(3), 439-452. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.1924083>

Azad, I. S., Al-Yaqout, A., & Al-Roumi, M., 2014. Antibacterial and immunity enhancement properties of anaesthetic doses of thyme (*Thymus vulgaris*) oil and three other anaesthetics in *Sparidentax hasta* and *Acanthopagrus latus*. J. King Saud Univ. Sci., 26(2), 101-106. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.12.003>

Badalamenti, N., Bruno, M., Schicchi, R., Geraci, A., Leporini, M., Gervasi, L., Tundis, R., Loizzo, M. R., 2022. Chemical compositions and antioxidant activities of essential oils, and their combinations, obtained from flavedo by-product of seven cultivars of Sicilian *Citrus aurantium* L. Molecules, 27(5), 1580. <https://doi.org/10.3390/molecules27051580>

Borotová, P., Galovičová, L., Vukovic, N. L., Vukic, M., Tvrdá, E., Kačániová, M., 2022. Chemical and biological characterization of *Melaleuca alternifolia* essential oil. Plants, 11(4), 558. <https://doi.org/10.3390/plants11040558>

Boukhris, M., Regane, G., Yangu, T., Sayadi, S., Bouaziz, M., 2012. Chemical composition and biological potential of essential oil from Tunisian *Cupressus sempervirens* L. J. Arid Land Stud., 22(1), 329-332.

Costa, C. M. S., Cruz, M. G., Lima, T. B. C., Ferreira, L. C., Ventura, A. S., Brandão, F. R., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Martins, M. L., Jerônimo, G. T., 2020. Efficacy of the essential oils of *Mentha piperita*, *Lippia alba* and *Zingiber officinale* to control the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* in *Colossoma macropomum*. Aquac. Rep., 18, 100414. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100414>

Couto, M. V. S., Meneses, J. O., Sousa, N. C., Cunha, A. S. M., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Fujimoto, R. Y., 2014. Teste "in vitro" do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* no controle de *Trichodina* sp. XIII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, Aracajú, p. 305. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/996383>

El Deen, A. I. N., Razin, A. M., 2009. Application of some medicinal Plants to eliminate *Trichodina* sp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Report Opinion, 12(17), 1-5.

Elmi, A., Ventrella, D., Barone, F., Carnevali, G., Filippini, G., Pisi, A., Benvenuti, S., Scozzoli, M., Bacci, M. L., 2019. In vitro effects of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia* essential oil) and its principal component terpinen-4-ol on swine spermatozoa. Molecules, 24(6), 1071. <https://doi.org/10.3390/molecules24061071>

Ersino, W., Teressa, H., Alemayo, T., 2020. Larvicidal activity of *Juniperus procera* extract against anopheles mosquito in *in vitro*, North Western Ethiopia. J. Med. Plant Res., 14(9), 445-450. <https://doi.org/10.5897/JMPR2019.6900>

Evergetis, E., Michaelakis, A., Papachristos, D. P., Badieritakis, E., Kapsaski-Kanelli, V. N., Haroutounian, S. A., 2016. Seasonal variation and bioactivity of the essential oils of two *Juniperus* species against *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894). Parasitol. Res., 115, 2175-2183.

Galovičová, L., Borotová, P., Valková, V., Vukovic, N. L., Vukic, M., Štefániková, J., Ďúranová, J., Kowalczewski, P. Ł., Čmíková, N., Kačániová, M., 2021. *Thymus*

vulgaris essential oil and its biological activity. *Plants*, 10(9), 1959. <https://doi.org/10.3390/plants10091959>

GhafariFarsani, H., Hoseinifar, S. H., Sheikhlari, A., Raissy, M., Chaharmahali, F. H., Maneepitaksanti, W., Faheem, M., Van Doan, H., 2022. The effects of dietary thyme oil (*Thymus vulgaris*) essential oils for common carp (*Cyprinus carpio*): growth performance, digestive enzyme activity, antioxidant defense, tissue and mucus immune parameters, and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquac. Nutr.*, 2022, 79422506. <https://doi.org/10.1155/2022/7942506>

Ghiasi, M., Binaii, M., Ghaednia, B., Farabi, S. M. V., Alavi, E. S., 2022. Evaluation of Eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) essential oil on growth performance, hemato-immunological parameters and resistance against *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Aquac. Dev.*, 16(2), 119-131.

Gholipourkanani, H., Buller, N., Lymbery, A., 2019. *In vitro* antibacterial activity of four nano-encapsulated herbal essential oils against three bacterial fish pathogens. *Aquac. Res.*, 50(3), 871-875. <https://doi.org/10.1111/are.13959>

Giatropoulos, A., Pitarokili, D., Papaioannou, F., Papachristos, D. P., Koliopoulos, G., Emmanouel, N., Tzakou, O., Michaelakis, A., 2013. Essential oil composition, adult repellency and larvicidal activity of eight Cupressaceae species from Greece against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.*, 112, 1113-1123. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3239-5>

Huang, K., Hu, G., Wang, R., Zeng, Q., Li, W., Zou, H., Wu, S., Wang, G., Li, M., 2022. *In vitro* assessment of Berberine against *Ichthyophthirius multifiliis* in Goldfish. *Pathogens*, 11(10), 1207. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101207>

Insuan, W., Chahomchuen, T., 2020. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil extracted from *Eucalyptus citriodora* leaf. *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, 48(2), 148-157. <https://doi.org/10.4014/mbl.1912.12016>

Ji-Hong, W., Yan-Li, W., Yu-Hua, L., Ji-Yuan, Z., Ze-Hong, L. I., 2017. Activity of two extracts of *Cynanchum paniculatum* against *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomonts. *Parasitol.*, 144(2), 179-185. <https://doi.org/10.1017/S003118201600144X>

Kačániová, M., Terentjeva, M., Vukovic, N., Puchalski, C., Roychoudhury, S., Kunová, S., Klůga, A., Tokár, M., Kluz, M., Ivanišová, E., 2017. The antioxidant and antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas* spp. isolated from fish. *Saudi Pharm. J.*, 25(8), 1108-1116. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.07.005>

Kaur, H., Bhardwaj, U., Kaur, R., 2021. *Cymbopogon nardus* essential oil: A comprehensive review on its chemistry and bioactivity. *J. Essent. Oil Res.*, 33(3), 205-220. <https://doi.org/10.1080/10412905.2021.1871976>

Khallaf, M. A., El-Bahrawy, A., Awad, A., Elkhatam, A., 2020. Prevalence and Histopathological Studies of *Trichodina* spp. Infecting *Oreochromis niloticus* in Behera Governorate, Egypt. *J. Curr. Vet. Res.*, 2(1), 1-7. <https://doi.org/10.21608/JCVR.2020.90213>

Kulkarni, R. R., Pawar, P. V., Joseph, M. P., Akulwad, A. K., Sen, A., Joshi, S. P., 2013. *Lavandula gibsoni* and *Plectranthus mollis* essential oils: chemical analysis and insect control activities against *Aedes aegypti*, *Anopheles sfttephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *J. Pest Sci.*, 86, 713-718. <https://doi.org/10.1007/s10340-013-0502-1>

Lima, L. R., Andrade, F. K., Alves, D. R., de Moraes, S. M., Vieira, R. S., 2021. Anti-acetylcholinesterase and toxicity against *Artemia salina* of chitosan microparticles loaded with essential oils of *Cymbopogon flexuosus*, *Pelargonium x* ssp and *Copaifera officinalis*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 167, 1361-1370. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.090>

Lin, L. Y., Chuang, C. H., Chen, H. C., Yang, K. M., 2019. Lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) essential oils: Volatile compounds, antioxidant capacity, and hypolipidemic effect. *Foods*, 8(9), 398. <https://doi.org/10.3390/foods8090398>

Machiani, M. A., Javanmard, A., Morshedloo, M. R., Maggi, F., 2018. Evaluation of yield, essential oil content and compositions of peppermint (*Mentha piperita* L.) intercropped with faba bean (*Vicia faba* L.). *J. Clean. Prod.*, 171, 529-537. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.062>

Malik, S., Mesquita, L. S. S., Silva, C. R., Mesquita, J. W. C., Rocha, E. S., Bose, J., Abiri, R., Figueiredo, P. M. S., Costa-Júnior, L. M., 2019. Chemical profile and

biological activities of essential oil from *Artemisia vulgaris* L. cultivated in Brazil. *Pharmaceuticals*, 12(2), 49. <https://doi.org/10.3390/ph12020049>

Marchiori, N., Martins, M. L., 2012. Contribuições ataxonomia de *Trichodina* com revisao da distribuição do gênero. *Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos*. Massoni, Maringá, 105-124.

Marzouk, M. S., Ibrahem, M. D., El-Khatib, N. R., Mohamad, A. S., 2018. Survey on some ectoparasitic infestation in *Sparus aurata* in mariculture and trials to treatment with an herbal drug. *Am. J. Res. Commun.*, 6, 50-65.

Monteschio, J. D. O., Vargas Junior, F. M., Silva, A. L. A., Chagas, R. A., Fernandes, T., Leonardo, A. P., Kaneko, I. N., Pinto, L. A. M., Guerrero, A., Melo Filho, A. A., Ferraz, V. P., Fagundes, G. M., Muir, J. P., 2021. Effect of copaíba essential oil (*Copaifera officinalis* L.) as a natural preservative on the oxidation and shelf life of sheep burgers. *PloS one*, 16(3), e0248499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248499>

Munda, S., Pandey, S. K., Dutta, S., Baruah, J., Lal, M., 2019. Antioxidant activity, antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Artemisia vulgaris* L. leaves from Northeast India. *J. Essent. Oil Bear. Plants*, 22(2), 368-379. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1602083>

Naas, C., Muhammad, H., Kloas, W., Müller-Belecke, A., 2024. Sodium chloride (NaCl) as a treatment against trichodiniasis for pike perch (*Sander lucioperca*) in recirculating aquaculture systems. *Aquac. Int.*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01383-2>

Nardoni, S., Najar, B., Fronte, B., Pistelli, L., Mancianti, F., 2019. *In vitro* activity of essential oils against *Saprolegnia parasitica*. *Molecules*, 24(7), 1270. <https://doi.org/10.3390/molecules24071270>

Nidhi, P., Rolta, R., Kumar, V., Dev, K., Sourirajan, A., 2020. Synergistic potential of *Citrus aurantium* L. essential oil with antibiotics against *Candida albicans*. *J. Ethnopharmacol.*, 262, 113135. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113135>

Nurudeen, N. D., Ayisi, C. L., Ampofo-Yeboah, A., 2022. Effects of *Eucalyptus globulus* leaf extract on growth performance, feed utilization and blood biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Veterinaria, 71(2), 175-189. <https://doi.org/10.51607/22331360.2022.71.2.175>

Park, J. W., Wendt, M., Heo, G. J., 2016. Antimicrobial activity of essential oil of *Eucalyptus globulus* against fish pathogenic bacteria. Lab. Anim. Res., 32, 87-90. <https://doi.org/10.5625/lar.2016.32.2.87>

Pathirana, H. N., Wimalasena, S. H., De Silva, B. C., Hossain, S., Heo, G. J., 2018. Antibacterial activity of lime (*Citrus aurantifolia*) essential oil and limonene against fish pathogenic bacteria isolated from cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish. Aquat. Life, 26(2), 131-139. <https://doi.org/10.2478/aopf-2018-0014>

Pontes, E. K. U., Melo, H. M., Nogueira, J. W. A., Firmino, N. C. S., de Carvalho, M. G., Catunda Júnior, F. E. A., Cavalcante, T. T. A., 2019. Antibiofilm activity of the essential oil of citronella (*Cymbopogon nardus*) and its major component, geraniol, on the bacterial biofilms of *Staphylococcus aureus*. Food Sci. Biotechnol., 28(3), 633-639. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0502-2>

Rguez, S., Essid, R., Adele, P., Msaada, K., Hammami, M., Mkadmini, K., Fares, N., Tabbene, O., Elkahoui, S., Portelli, D., Ksouri, R., Sellami, I. H., 2019. Towards the use of *Cupressus sempervirens* L. organic extracts as a source of antioxidant, antibacterial and antileishmanial biomolecules. Ind. Crops Prod., 131, 194-202. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.056>

Roomiani, L., Soltani, M., Akhondzadeh Basti, A., Mahmoodi, A., Taheri Mirghaed, A., Yadollahi, F., 2013. Evaluation of the chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus* against *Streptococcus iniae* the cause of zoonotic disease in farmed fish. Iran. J. Fish. Sci., 12(2), 702-716. [20.1001.1.15622916.2013.12.3.17.4](https://doi.org/10.1001.1.15622916.2013.12.3.17.4)

Rosato, A., Carocci, A., Catalano, A., Clodoveo, M. L., Franchini, C., Corbo, F., Carbonara, G. G., Carrieri, A., Fracchiolla, G., 2018. Elucidation of the synergistic

action of *Mentha Piperita* essential oil with common antimicrobials. PloS one, 13(8), e0200902. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200902>

Sadeghi, F., Ahmadifar, E., Shahriari Moghadam, M., Ghiyasi, M., Dawood, M. A., Yilmaz, S., 2021. Lemon, *Citrus aurantifolia*, peel and *Bacillus licheniformis* protected common carp, *Cyprinus carpio*, from *Aeromonas hydrophila* infection by improving the humoral and skin mucosal immunity, and antioxidative responses. J. World Aquac. Soc., 52(1), 124-137. <https://doi.org/10.1111/jwas.12750>

Salario, R. E. G., 2018. Atividade *in vitro* de óleos essenciais contra *Neoechynorhynchus buttnerae* de tambaqui e seus efeitos nos hospedeiros. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/154582>

Santos, A. A., Wanderley-Teixeira, V., Cruz, G. S., Dutra, K. A., Navarro, D. M. D. A. F., Oliveira, J. V., Lapa-Neto, C. J. C., Barbosa, D. R. S., Teixeira, Á. A. C., 2021. Essential oil toxicity on biological and reproductive parameters of *Alabama argillacea* (Hübner)(Lepidoptera: Erebidae). Acta Histochem., 123(4), 151714. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151714>

Selim, S. A., Adam, M. E., Hassan, S. M., Albalawi, A. R., 2014. Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). BMC Complement. Altern. Med., 14, 1-8. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-179>

Sharafati-Chaleshtori, R., Rokni, N., Rafieian-Kopaei, M., Drees, F., Salehi, E., 2018. Antioxidant and antibacterial activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil in beef burger. J. Agric. Sci. Technol. 17, 817-826.

Silva, E., Deschamps, G. T., Matter, F. L., Bertoldi, F. C., Aldegunde, M., Silva, D. F., Lopes, C., Jatobá, A., Weber, R. A., 2021. The anaesthetic efficacy of *Eucalyptus globulus* essential oil on silver catfish (*Rhamdia quelen*). Aquac. Res., 52(11), 5190-5197. <https://doi.org/10.1111/are.15388>

Silva, S., Alves, N., Silva, P., Vieira, T., Maciel, P., Castellano, L. R., Bonan, P., Velozo, C., Albuquerque, D., 2019. Antibacterial Activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zingiber officinale*, *Citrus aurantium* bergamia, and *Copaifera officinalis* Alone and

in Combination with Calcium Hydroxide against *Enterococcus faecalis*. BioMed Res. Int., 2019, 8129439. <https://doi.org/10.1155/2019/8129439>

Smith, S. A., Schwarz, M. H., 2019. Dealing with Trichodina and Trichodina-like species. Commercial Fish & Shellfish Technology Fact Sheet, Virginia Cooperative Extension, Virginia Tech, Virginia State University, Publication No. 600-205.

Spadaro, F., Costa, R., Circosta, C., Occhiuto, F., 2012. Volatile composition and biological activity of key lime *Citrus aurantifolia* essential oil. Nat. Prod. Commun., 7(11), 1523-1526. <https://doi.org/10.1177/1934578X12007011>

Tahghighi, A., Maleki-Ravasan, N., Dinparast Djadid, N., Alipour, H., Ahmadvand, R., Karimian, F., & Yousefinejad, S., 2019. GC–MS analysis and anti–mosquito activities of *Juniperus virginiana* essential oil against *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). Asian Pac. J. Trop. Biomed., 9(4), 168-175. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.256730>

Tavares-Dias, M., 2018. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. Aquat. Living Resour., 31, 13. <https://doi.org/10.1051/alr/2018001>

Tong, F., Bloomquist, J. R., 2013. Plant essential oils affect the toxicities of carbaryl and permethrin against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol., 50(4), 826-832. <https://doi.org/10.1603/ME13002>

Toutou, M. M., Soliman, A. A., Elokaby, M. A., Ahmed, R. A., S, B. E., 2018. Growth performance and biochemical blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, and thinlip mullet, *Liza ramada*, fed a diet supplemented with lemon (*Citrus aurantifolia*) peel in a polyculture system. Egypt. J. Aquat. Biol. Fish., 22(3), 183-192. <https://doi.org/10.21608/EJABF.2018.23920>

Tran, T. H., Nguyen, H. H. H., Nguyen, D. C., Nguyen, T. Q., Tan, H., Nhan, L. T. H., Nguyen, D. H., Tran, L. D., Do, S. T., Nguyen, T. D., 2018. Optimization of microwave-assisted extraction of essential oil from vietnamese basil (*Ocimum basilicum* L.) using response surface methodology. Processes, 6(11), 206. <https://doi.org/10.3390/pr6110206>

Tural, S., Durmaz, Y., Urçar, E., Turhan, S., 2019. Antibacterial activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.), Laurel (*Lauris nobilis* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and parsley (*Petroselinum crispum* L.) essential oils against some fish pathogenic bacteria. *Acta Aquat. Turc.*, 15(4), 440-447. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.549380>

Valladão, G. M. R., Alves, L. O., Pilarski, F., 2016a. Trichodiniasis in Nile tilapia hatcheries: diagnosis, parasite: host-stage relationship and treatment. *Aquaculture*, 451, 444-450. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.030>

Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Ikefuti, C. V., Cruz, C., Levy-Pereira, N., Rodrigues, M. V. N., Pilarski, F., 2016b. Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. *J. Fish Dis.*, 39(10), 1143-1152. <https://doi.org/10.1111/jfd.12447>

Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Kotzent, S., Assane, I. M., Pilarski, F., 2019. Effects of dietary thyme essential oil on hemato-immunological indices, intestinal morphology, and microbiota of Nile tilapia. *Aquac. Int.*, 27, 399-411. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0332-5>

Valladao, G. M. R., Gallani, S. U., Padua, S. B., Martins, M. L., Pilarski, F., 2014. *Trichodina heterodentata* (Ciliophora) infestation on *Prochilodus lineatus* larvae: a host-parasite relationship study. *Parasitology*, 141(5), 662-669. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001480>

Vieira, M., Bessa, L. J., Martins, M. R., Arantes, S., Teixeira, A. P. S., Mendes, Â., Costa, P. M., Belo, A. D. F., 2017. Chemical composition, antibacterial, antibiofilm and synergistic properties of essential oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and seven Mediterranean aromatic plants. *Chem. Biodivers.*, 14(6), e1700006. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700006>

Vivekanandhan, P., Usha-Raja-Nanthini, A., Valli, G., Shivakumar, M. S., 2020. Comparative efficacy of *Eucalyptus globulus* (Labill) hydrodistilled essential oil and temephos as mosquito larvicide. *Nat. Prod. Res.*, 34(18), 2626-2629. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1547290>

- Vourlioti-Arapi, F., Michaelakis, A., Evergetis, E., Koliopoulos, G., Haroutounian, S. A., 2012. Essential oils of indigenous in Greece six *Juniperus* taxa: Chemical composition and larvicidal activity against the West Nile virus vector *Culex pipiens*. Parasitol. Res., 110, 1829-1839. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2706-8>
- Wang, M., Avula, B., Wang, Y. H., Zhao, J., Avonto, C., Parcher, J. F., Raman, V., Zweigenbaum, J. A., Wylie, P. L., Khan, I. A., 2014. An integrated approach utilising chemometrics and GC/MS for classification of chamomile flowers, essential oils and commercial products. Food Chem., 152, 391-398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.118>
- Xu, D. H., Zhang, Q. Z., Zhang, D., 2016. Two *in vitro* methods for screening potential parasiticides against *Ichthyophthirius multifiliis* using *Tetrahymena thermophila*. J. Fish Dis., 39(3), 285-294. <https://doi.org/10.1111/jfd.12361>
- Yigit, N. O., Metin, S., Sabuncu, O. F., Didinen, B. I., Didinen, H., Ozmen, O., Koskan, O., 2022. Efficiency of *Ocimum basilicum* and *Eucalyptus globulus* essential oils on anesthesia and histopathology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. World Aquac. Soc., 53(5), 1051-1061. <https://doi.org/10.1111/jwas.12911>
- Yohana, R., Chisulumi, P. S., Kidima, W., Tahghighi, A., Maleki-Ravasan, N., Kweka, E. J., 2022. Anti-mosquito properties of *Pelargonium roseum* (Geraniaceae) and *Juniperus virginiana* (Cupressaceae) essential oils against dominant malaria vectors in Africa. Malar. J., 21(1), 219. <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04220-8>
- Zargar, A., Rahimi-Afzal, Z., Soltani, E., Mirghaed, A. T., Ebrahimzadeh-Mousavi, H. A., Soltani, M., Yuosefi, P., 2019. Growth performance, immune response and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed *Thymus vulgaris* essential oils. Aquac. Res., 50(11), 3097-3106. <https://doi.org/10.1111/are.14243>
- Zarrad, K., Hamouda, A. B., Chaieb, I., Laarif, A., Jemâa, J. M. B., 2015. Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesterase activity of the Tunisian *Citrus aurantium* L. essential oils. Ind. Crops Prod., 76, 121-127. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.039>

Zhang, K., Yao, L., 2018. The anxiolytic effect of *Juniperus virginiana* L. essential oil and determination of its active constituents. *Physiol. Behav.*, 189, 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.01.004>

Tabela1. Identificação e características dos óleos essenciais avaliados.

Nome Científico	Nome comum Abreviação	Forma de extração	Origem
<i>Artemisia vulgaris</i>	Artemísia OEAV	Destilação a vapor da planta	Marrocos
<i>Citrus aurantifolia</i>	Limão-Tahiti OECA	Prensagem da casca	Brasil
<i>Citrus aurantium</i>	Laranja amarga OECT	Destilação a vapor de folhas e galhos verdes	---
<i>Copaiba officinalis</i>	Copaíba OECO	Destilação a vapor da Resina	Brasil
<i>Cupressus sempervirens</i>	Cipreste OECS	Destilação a vapor de folhas e galhos novos	Índia
<i>Cymbopogon nardus</i>	Citronela OECN	Destilação a vapor da planta	Brasil
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Eucalipto citriodora OEEC	Destilação a vapor de folhas	Brasil
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto OEEG	Destilação a vapor de folhas	Brasil
<i>Juniperus virginiana</i>	Cedro OEJV	Destilação a vapor da madeira	USA
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Melaleuca OEMA	Destilação a vapor de folhas	Austrália
<i>Mentha piperita</i>	Hortelã-pimenta	Destilação a vapor	Índia

	OEMP	de folhas	
<i>Ocimum basisicum</i>	Manjeriçã OEOB	Destilação a vapor de folhas	Índia
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho OETV	Destilação a vapor da planta	Índia

--- Origem não informada.

Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais de plantas usados no estudo obtida por análise de GC–FID

Grupo Químico	Componentes (%)	Óleo Essencial ^a												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Monoterpenos Hidrocarbonetos														
	E-β-Ocimeno	-	-	1,4	-	-	-	-	-	-	-	1,7	-	-
	Canfeno	1,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7
	Limoneno	14,2	57,6	13,7	-	4,7	-	1,3	12,1	-	1,9	0,5	-	0,8
	Mirceno	0,5	1,4	3,9	-	1,9	2,2	0,4	0,5	-	0,8	-	-	1,6
	p-Cimeno	0,8	3,3	-	-	0,7	-	-	4,4	-	3,6	-	-	20,8
	Sabineno	-	1,7	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-
	Terpinoleno	0,6	0,6	-	-	2,2	-	-	0,2	-	3,2	0,2	-	-
	α-Felandreno	0,5	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-	-	-	-
	α-Pineno	1,6	2,0	-	-	52,5	-	-	4,1	-	2,6	-	-	0,4
	α-Terpineno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,5	-	-	-
	α-Tujeno	-	0,5	-	-	0,5	-	-	0,1	-	0,9	-	-	-
	β-Pineno	1,1	10,9	8,4	-	2,2	-	-	1,9	-	0,7	-	-	-
	γ-Terpineno	1,6	11,5	-	-	0,4	-	-	0,7	-	19,4	0,6	-	-
	δ-3-Careno	-	-	-	-	20,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Monoterpenos Oxigenados														
Álcool	Carveol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-

Tabela 2. Continuação

Grupo Químico	Componentes (%)	Óleo Essencial ^a												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Aldeído	Citronelol	-	-	-	-	-	10,9	7,2	-	-	-	-	-	-
	Dehidrocarveol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2
	Geraniol	-	-	-	-	-	34,7	-	-	-	-	-	-	-
	Hidrato de Cis-Sabineno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
	Isoborneol	-	-	-	-	-	1,4	1,6	-	-	-	-	-	-
	Isopulegol	-	-	-	-	-	-	0,4	0,1	-	-	-	-	-
	Levomentol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,2	-	-
	Linalol	2,9	-	16,5	-	-	1,2	-	-	-	-	1,5	16,9	8,0
	Mentol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	41,8	-	-
	Neoisomentol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9	-	-
	Terpinen-4-ol	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	42,3	-	-	-
	α -Terpineol	8,1	-	3,9	-	0,4	-	-	-	-	3,2	1,2	0,2	1,6
	β -Terpineol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-
	Citronelal	-	-	-	-	-	24,8	64,4	-	-	-	-	-	-
	Geranial	-	2,1	-	-	-	6,1	-	-	-	-	-	-	-
	Neral	-	1,3	-	-	-	4,6	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 2. Continuação

Grupo Químico	Componentes (%)	Óleo Essencial ^a												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Ésteres	Acetato de Bornila	-	-	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-
	Acetato de Citronelila	-	-	-	-	-	-	6,9	-	-	-	-	-	-
	Acetato de Geranila	-	-	2,6	-	-	4,7	-	-	-	-	-	-	-
	Acetato de Linalila	-	-	35,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Acetato de Mentila	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,6	-	-
	Acetato de Nerila	-	-	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Acetato de Terpinila	-	-	-	-	2,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Éteres	Anetol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-
	Estragol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	77,4	-
Cetonas	Canfora	17,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Isomentona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,7	-	-
	Mentona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,7	-	-
	Piperitona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
	Pulegona	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-
Óxidos	1,8-Cineol	14,2	-	-	-	-	-	-	73,0	-	2,9	3,5	0,3	-
Fenóis	Carvacrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,9
	Eugenol	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 2. Continuação

Grupo Químico	Componentes (%)	Óleo Essencial ^a												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	Timol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53,3
Sesquiterpenos Hidrocarbonetos														
	Alloaromadendreno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-
	Aromadendreno	2,1	1,4	-	-	-	-	-	-	-	1,9	-	-	-
	Chamigreno	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	-	-	-	-
	Cis-Tujopseno	-	-	-	-	-	-	-	-	26,9	-	-	-	-
	Cupareno	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-
	Germacreno D	-	-	-	12,0	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-
	Longipineno	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	-	-	-	-
	α -Bergamoteno	-	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
	α -Cadineno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-
	α -Cariofileno	-	-	-	8,0	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-
	α -Cedreno	-	-	-	-	-	-	-	-	26,3	-	-	-	-
	α -Copaeno	-	-	-	5,2	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-
	α -Cubebeno	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	α -Gurjuneno	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	0,5	-	0,5	-
	α -Himacaleno	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 2. Continuação

Grupo Químico	Componentes (%)	Óleo Essencial ^a												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	α -Muuroleno	-	-	-	3,1	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
	β -Cariofileno	8,4	-	9,2	55,8	0,4	1,6	0,5	-	-	0,5	1,3	0,4	-
	β -Cedreno	-	-	-	-	-	-	-	-	6,1	-	-	-	-
	β -Elemeno	-	-	-	1,3	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-
	β -Guaieno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-	-
	β -Himacaleno	7,3	-	-	-	-	-	-	-	3,3	-	-	-	-
	γ -Cadineno	-	1,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	γ -Muuroleno	-	-	-	-	-	1,3	-	-	-	0,5	-	-	-
	δ -Cadineno	-	-	-	1,7	-	-	-	0,6	-	1,9	0,3	-	-
	δ -Elemeno	-	-	-	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sesquiterpenos Oxigenados														
Álcool	Cedrol	-	-	-	-	2,7	-	-	-	25,8	-	-	-	-
	Espatuleno	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-
	Isocedranol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-
	Nerolidol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6	-
	Viridiflorol	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Widdrol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-

Tabela 2. Continuação

Grupo Químico	Componentes (%)	Óleo Essencial ^a												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Ésteres	α-Turmerona	1,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	β-Turmerona	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Éteres	Epoxido Bisaboleno	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mentofurano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-
Óxidos	Óxido de β-Cariofileno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-
Componentes identificados (%)		93,0	97,4	97,1	91,3	94,3	94,1	82,7	99,9	95,1	98,8	94,7	99,0	97,3
Monoterpenos Hidrocarbonetos (%)		22,8	89,5	27,4	0,0	86,1	2,2	1,7	25,8	0,0	41,6	3,0	0,0	24,3
Monoterpenos Oxigenados (%)		42,5	4,6	60,5	0,0	4,5	88,4	80,5	73,5	0,0	48,7	88,3	96,2	73,0
Sesquiterpenos Hidrocarbonetos (%)		20,5	3,3	9,2	90,3	1,0	2,9	0,5	0,6	68,1	8,2	3,0	1,2	0,0
Sesquiterpenos Oxigenados (%)		7,2	0,0	0,0	1,0	2,7	0,6	0,0	0,0	27,0	0,3	0,4	1,6	0,0

^aÓleos Essenciais: 1- Artemísia - *Artemisia vulgaris* (OEAV), 2- Limão Tahiti *Citrus aurantifolia* (OECA), 3- Petitgrain *Citrus aurantium* (OECT), 4- Copaíba *Copaifera officinalis* (OECO), 5- Cipreste *Cupressus sempervirens* (OECS), 6- Citronela *Cymbopogon nardus* (OECN), 7- Eucalipto Citriodora *Eucalyptus citriodora* (OEEC), 8- Eucalipto *Eucalyptus globulus* (OEEG), 9- Cedro *Juniperus virginiana* (EOJV), 10- Melaleuca *Melaleuca alternifolia* (OEMA), 11- Hortelã Pimenta *Mentha piperita* (OEMP), 12- Manjerição *Ocimum basilicum* (EOOB), and 13- Tomilho *Thymus vulgaris* (OETV).

MANUSCRITO II

Toxicidade de óleos essenciais em peixes e eficácia de óleo essencial de *Eucalyptus globulus* contra tricodinídeos em tilápia-do-Nilo

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade dos óleos essenciais de *Citrus aurantifolia* (OECA), *Cupressus sempervirens* (OECS), *Eucalyptus globulus* (OEEG), *Juniperus virginiana* (OEJV) e *Thymus vulgaris* (OETV) pelo efeito citotóxico contra eritrócitos de tilápia-do-Nilo, avaliar os efeitos embriotóxicos de OECA, OECS, OEEG e OETV em zebrafish, além da avaliação da eficácia de OEEG no controle de tricodinídeos de juvenis de tilápia-do Nilo. No teste de citotoxicidade não foi observada hemólise nas doses de 60 e 120 $\mu\text{L.l}^{-1}$, enquanto na dose 480 $\mu\text{L.l}^{-1}$ todos óleos essenciais testados causaram hemólise sendo OEEG menos citotóxico com 2,33% de lise de eritrócitos e OEJV o mais tóxico com 25,41%. No teste de embriotoxicidade observou-se efeitos tóxicos e teratogênicos nos embriões expostos a OECA, OECS e OETV, entretanto, a exposição de embriões de zebrafish a OEEG não demonstrou toxicidade em nenhuma dose testada. O tratamento de juvenis de tilápia-do-Nilo contra tricodinídeos com OEEG apresentou eficácia entre 68,3 e 73,9% nas doses de 60 e 80 $\mu\text{L.l}^{-1}$ respectivamente, sendo este um uso promissor deste composto na aquicultura.

Palavras-chave: hemólise, embrião, 1,8 cineol, tratamento

Toxicity of essential oils in fish and efficacy of *Eucalyptus globulus* essential oil against trichodinids in Nile tilapia

Abstract

The present study aimed to evaluate the toxicity of the essential oils of *Citrus aurantifolia* (OECA), *Cupressus sempervirens* (OECS), *Eucalyptus globulus* (OEEG), *Juniperus virginiana* (OEJV) and *Thymus vulgaris* (OETV) for their cytotoxic effect against Nile tilapia erythrocytes, to evaluate the embryotoxic effects of OECA, OECS, OEEG and OETV in zebrafish, in addition to evaluating the effectiveness of OEEG in controlling trichodinids in Nile tilapia juveniles. In the cytotoxicity test, hemolysis was not observed at doses of 60 and 120 $\mu\text{l.l}^{-1}$, while at dose 480 $\mu\text{l.l}^{-1}$ all essential oils tested caused hemolysis, with OEEG being less cytotoxic with 2.33% lysis of erythrocytes and OEJV the most toxic with 25.41%. In the embryotoxicity test, toxic and teratogenic effects were observed in embryos exposed to OECA, OECS and OETV, however, exposure of zebrafish embryos to OEEG did not demonstrate toxicity at any dose tested. The treatment of Nile tilapia juveniles against trichodinids with OEEG showed efficacy between 68.3 and 73.9%, which is a promising use of this compound in aquaculture.

Keywords: hemolysis, embryo, 1,8 cineole, treatment

1 Introdução

A produção de peixes no Brasil apresenta diferentes níveis de tecnologia, sendo a *Oreochromis niloticus* a espécie mais produzida. Atualmente, além da expansão da atividade aquícola, a produção nacional de espécies estabelecidas como a tilápia-do-Nilo está avançando para etapa de refinamento da produção, permitindo a adoção de tecnologias que propiciem o aumento da produtividade além da redução de perdas, sendo que, a ocorrência de enfermidades bacterianas ou parasitárias representam uma grande fonte de perdas (Leira et al., 2017).

Dentre as enfermidades parasitárias, a tricodiníase destaca-se principalmente nas fases iniciais de desenvolvimento ocasionando grandes perdas na larvicultura e alevinagem de peixes (Valladão et al., 2016; Abdelkhalek et al., 2018), além de infestar animais adultos (Zago et al., 2014; Jerônimo et al., 2020).

Atualmente, no Brasil, o número de produtos registrados para o uso no controle de enfermidades parasitárias em peixes é reduzido (SIPEAGRO, 2023), sendo então necessária a realização de estudos para a descoberta e/ou validação de compostos seguros para serem empregados em produções comerciais. Diversas características devem ser preconizadas ao adotar um composto para o tratamento em ambientes aquáticos, sendo elas: não apresentar dano ao tecido do animal tratado, apresentar degradação rápida, não deixar resíduo no ambiente ou no animal tratado, não influenciar na qualidade da água, não oferecer riscos a humanos e animais, apresentar baixo custo e ser de fácil aplicação (Martins, 2004). Nesse sentido, a utilização de óleos essenciais de plantas pode ser vantajosa por poder atender algumas características importantes para seu uso.

Antes da escolha de qualquer composto para a avaliação na efetividade no controle de agentes patogênicos, deve-se levar em consideração a interação do produto com o hospedeiro devendo ser realizados testes para elucidar a toxicidade. Os testes de toxicidade podem ser por avaliações agudas, subcrônicas e crônicas por 24 a 96 horas (Tavares-Dias, 2018). Geralmente em testes de toxicidade aguda são necessários um elevado número de peixes jovens e/ou adultos, principalmente se várias moléculas forem avaliadas. Dessa forma a realização de triagem por outros testes toxicológicos como citotoxicidade e

embriotoxicidade podem ser interessantes para a redução do número de animais utilizados (Rufli e Springer, 2011), além da redução de custos e tempo.

Por fim, a elucidação da eficácia do produto contra os parasitos no seu hospedeiro torna-se a principal etapa a ser realizada, pois, neste tipo de avaliação é que podemos obter resultados que evidenciem ou não a capacidade antiparasitária do composto e as condições que devem ser adotadas em sistemas de criação (Tavares-Dias, 2018).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade dos óleos essenciais de *Citrus aurantifolia* (OECA), *Cupressus sempervirens* (OECS), *Eucalyptus globulus* (OEEG), *Juniperus virginiana* (OEJV) e *Thymus vulgaris* (OETV) através da citotoxicidade contra eritrócitos de tilápia-do-Nilo, avaliar os efeitos embriotóxicos de OECA, OECS, OEEG e OETV em zebrafish, além da avaliação da eficácia do OEEG no controle de tricodinídeos de juvenis de tilápia-do Nilo.

2 Material e Métodos

Todos os procedimentos adotados no estudo estão de acordo com as normas dos princípios éticos em pesquisa animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal, os quais foram aprovados sob o protocolo nº 5880/23.

Os cinco óleos essenciais usados nos experimentos foram adquiridos da empresa Phytoterapica®, sendo as características dos mesmos descritos na Tabela 1.

2.1 Teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade consistiu na avaliação da atividade hemolítica dos óleos essenciais *Citrus aurantifolia* (OECA), *Cupressus sempervirens* (OECS), *Eucalyptus globulus* (OEEG), *Juniperus virginiana* (OEJV) e *Thymus vulgaris* (OETV) contra eritrócitos de tilápia-do-Nilo. Foi utilizado tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) como controle negativo e solução de Triton X-100 1% como controle positivo conforme descrito por Ahmad et al. (2010).

Tabela 1. Identificação e características dos óleos essenciais usados no experimento

Nome Científico	Nome comum Abreviação	Forma de extração	Origem	Densidade	Principais componentes
<i>Citrus aurantifolia</i>	Limão-Tahiti OECA	Prensagem da casca	Brasil	0,864	Limoneno (57,6%), γ -Terpineno (11,5%) e β -Pineno (10,9%)
<i>Cupressus sempervirens</i>	Cipreste OECS	Destilação a vapor de folhas e galhos novos	Índia	0,860	α -Pineno (52,5%), δ -3-Careno (20,2%) e Limoneno (4,7%)
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto OEEG	Destilação a vapor de folhas	Brasil	0,912	1,8-Cineol (73,0%), Limoneno (12,1%) e p -Cimeno (4,4%)
<i>Juniperus virginiana</i>	Cedro OEJV	Destilação a vapor da madeira	USA	0,958	Cis-Thujopseno (26,9%), α -Cedreno (26,3%) e Cedrol (25,8%)
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho OETV	Destilação a vapor da planta	Índia	0,909	Timol (53,3%), p -Cimeno (20,8%) e Carvacrol (8,9%)

Para esta análise, o sangue foi coletado de seis juvenis de tilápia-do-Nilo saudáveis com auxílio de seringa com heparina. Os eritrócitos foram lavados três vezes por centrifugação (500x g por 5 minutos a 4°C) com PBS. Em seguida foi preparada uma solução contendo 1% de eritrócitos (v/v) em suspensão com PBS. Microtubos do tipo eppendorf de 1,5 ml contendo suspensão de eritrócitos a 1% e as diferentes concentrações de óleo essencial (60, 120, 240 e 480 µl.l⁻¹) ou solução controle (controle de solvente DMSO a 360, 720, 1440 e 2880 µl.l⁻¹, controle negativo com PBS ou controle positivo com 1% de Triton X-100) foram incubadas por 1 hora a 37 °C, seguida por centrifugação a 500x g por 5 minutos a 4°C. Alíquotas de 100 µl de sobrenadante foram transferidas para microplacas de 96 poços e a absorbância das amostras a 540 nm foi determinada. Todas as concentrações foram analisadas em sextuplicata.

Para cada concentração de OE analisada foram calculados os percentuais de lise de eritrócitos pela fórmula $\% Lise = \frac{(A_{EO} - A_{PBS})}{(A_T - A_{PBS})} \times 100$, onde A_{EO}, A_{PBS} e A_T representam absorbâncias das amostras, PBS e Triton X-100 respectivamente.

2.2 Teste de embriotoxicidade

2.2.1 Obtenção dos embriões de Zebrafish

Os embriões de Zebrafish (*Danio rerio*) utilizados no teste foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos. As matrizes para obtenção de embriões são mantidas separadas por sexo em aquários a 28°C, pH 7,0, em fotoperíodo 14 h luz: 10 h escuro e alimentadas com ração Gemma® duas vezes ao dia. Para obtenção dos embriões, as matrizes foram selecionadas por características fenotípicas que evidenciam a capacidade de reprodução como o ventre abaulado das fêmeas e a coloração amarelada evidente no ventre e nadadeiras peitorais nos machos. Os animais selecionados para reprodução foram mantidos juntos em um aquário durante a noite na proporção de 2 machos para 1 fêmea e os embriões coletados pela manhã 10 minutos após a fertilização (mpf). Para verificar a qualidade e integridade dos embriões, os mesmos passaram por análise sob microscópio óptico invertido 60 mpf, sendo então selecionados para a realização do teste quando a taxa de fertilização superior a 90% foi verificada.

2.2.2 Preparo das soluções testadas

Foram utilizados os óleos essenciais de *Citrus aurantifolia* (OECA), *Cupressus sempervirens* (OECS), *Eucalyptus globulus* (OEEG) e *Thymus vulgaris* (OETV). Utilizando as densidades de cada óleo essencial, foram pipetados valores correspondentes para o preparo de 20 ml de solução a 100 ou 200 mg.l⁻¹ de óleo, acrescido de solubilizante DMSO 0,1% e posterior solubilização em meio embrionário E3 (5 mM NaCl; 0,17 mM KCl; 0,4 mM CaCl₂; 0,16 mM MgSO₄). As concentrações testadas foram obtidas por diluição seriada da solução inicial, sendo 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 mg.l⁻¹ para OECA, OECS e OETV, enquanto para o OEEG as concentrações testadas foram 200, 100, 50, 25 e 12,5 mg.l⁻¹. Como controle positivo foi adotada uma solução contendo 4 mg.l⁻¹ de 3,4 dicloroanilina em meio E3 e a solução controle de solvente consistiu em meio embrionário E3 acrescido de 0,1% de DMSO.

2.2.3 Procedimento experimental

Para avaliar a toxicidade aguda, a diretriz 236 da OCDE foi utilizada, na qual 125 embriões foram selecionados para cada composto. Embriões com 1,5 h pós fertilização (hpf) foram distribuídos de forma individualizada em placas de 96 poços e expostos às cinco concentrações logarítmicas dos compostos por 144 h (n= 25). Nas primeiras 96 h, a viabilidade dos embriões foi avaliada a cada 24 h de acordo com a observação de desfechos indicadores de letalidade como: coagulação embrionária, ausência de descolamento da cauda do saco vitelínico, alterações na formação de somitos e ausência de batimentos cardíacos. Além dos indicadores de letalidade, as alterações no desenvolvimento dos embriões foram observadas e registradas diariamente pelo período de 144 h para avaliação da teratogenia e viabilidade das larvas. Todos os testes foram realizados com grupo controle negativo (E3, n=25); Controle de placa (E3, n=4); grupo controle positivo (3,4 dicloroanilina 4 mg.l⁻¹, n=25) e grupo controle de solvente (E3 + 0,1% DMSO, n=25). Para garantir que durante o período experimental os embriões fossem expostos a todos os compostos contidos nos óleos essenciais, nas primeiras 96 h, 80% da solução de cada poço foi substituído por soluções recém preparadas após a avaliação dos embriões.

2.3 Atividade *in vivo* de óleo essencial contra tricodinídeos.

Para avaliar a capacidade de eliminação dos parasitos pelo óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, o mesmo foi testado em três concentrações diferentes (40, 60 e 80 mg.l⁻¹), além do controle de solvente (0,1% de DMSO) e controle negativo (somente água), todos em triplicata.

Para este experimento 75 juvenis de tilápia-do-Nilo com peso de 2,15 ± 0,48g, naturalmente infectados com tricodinídeos, foram distribuídos em aquários com capacidade de 2,5 litros (5 peixes por aquário), mantidos sem renovação de água e com aeração contínua. A exposição dos peixes ao OEEG foi realizada por um período de 1 h, com a adição do composto solubilizado em DMSO diretamente na água dos aquários, seguida pela troca de 90% da água após o período de exposição. Um segundo período de exposição foi realizado 24h após, com o objetivo de potencializar os efeitos do composto testado.

Durante e após os períodos de exposição, os animais foram observados quanto a possíveis alterações comportamentais ou efeitos tóxicos dos componentes testados. Para avaliar os efeitos antiparasitários do OEEG, 24 horas após a segunda exposição, três peixes de cada aquário tiveram a superfície corporal raspada com lâmina para microscopia, o conteúdo adicionado em microtubos e o volume completado para 2,0 ml com solução de formol 1:4000. O conteúdo do raspado foi posteriormente analisado em câmara de Sedgewick Rafter sob microscopia óptica em aumento de 40x e o número de parasitos quantificados. A eficácia do óleo foi calculada considerando a redução no número total de parasitos por peixe dos grupos tratados em comparação com o total de parasitos do grupo controle, sendo então obtido pela fórmula $Ef = \frac{(N_{Cont} - N_{Trat})}{(N_{Cont})} \times 100$, em que Ef = eficácia do controle de parasitos (%), Ncont = número médio de parasitos do grupo controle e Ntrat = número médio de parasitos nos grupos tratados.

2.4 Análise Estatística:

Para a citotoxicidade os valores percentuais de lise de eritrócitos foram analisados quanto a normalidade e homoscedasticidade e transformados por raiz quadrada quando necessário. Os dados foram então analisados usando one-way

ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Holm-Sidak ao nível de significância de 0,05.

Os resultados da embriotoxicidade foram analisados pelo teste estatístico Log-rank (Mantel-Cox) comparando todos os grupos com o grupo controle negativo (meio E3). Os valores de p foram corrigidos pela metodologia de Bonferroni e considerado nível de significância de 0,05. Foi utilizado o software GraphPad Prism 9.4. As curvas de dose-resposta foram plotadas e analisadas por Regressão Probit usando o software MedCalc 22.009, considerando $p < 0,05$.

Os dados de eficácia de tratamento obtidos no teste de atividade *in vivo* do OEEG contra tricodinídeos foram analisados quanto a normalidade e homoscedasticidade, transformados por arco seno e posteriormente analisados usando one-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey, considerando 0,05 como nível de significância.

3 Resultados

3.1 Citotoxicidade

O tratamento controle negativo com tampão fosfato salino (PBS) não apresentou lise, enquanto o tratamento com Triton X-100 a 1% apresentou lise de 100% dos eritrócitos de tilápia-do-Nilo. A atividade hemolítica de cada OE que depende da sua concentração ($480\text{--}60\ \mu\text{L.l}^{-1}$) é mostrada na Figura 1. Todos os óleos apresentaram níveis reduzidos de atividade hemolítica nas concentrações testadas quando comparados com o controle positivo. Entretanto, quando comparados com o controle negativo, na maior concentração testada ($480\ \mu\text{L.l}^{-1}$) todos os óleos apresentaram lise de eritrócitos, sendo que OEEG e OEJV apresentaram a menor (2,33%) e maior (25,41%) porcentagem de lise observada, respectivamente.

Nas doses de 60 e $120\ \mu\text{L.l}^{-1}$ não foi observada toxicidade em nenhum dos óleos testados, bem como OEEG, OECS e OECA em $240\ \mu\text{L.l}^{-1}$. Em todas as doses testadas o controle de solvente (DMSO) não diferiu do controle negativo (PBS) não sendo tóxico para os eritrócitos.

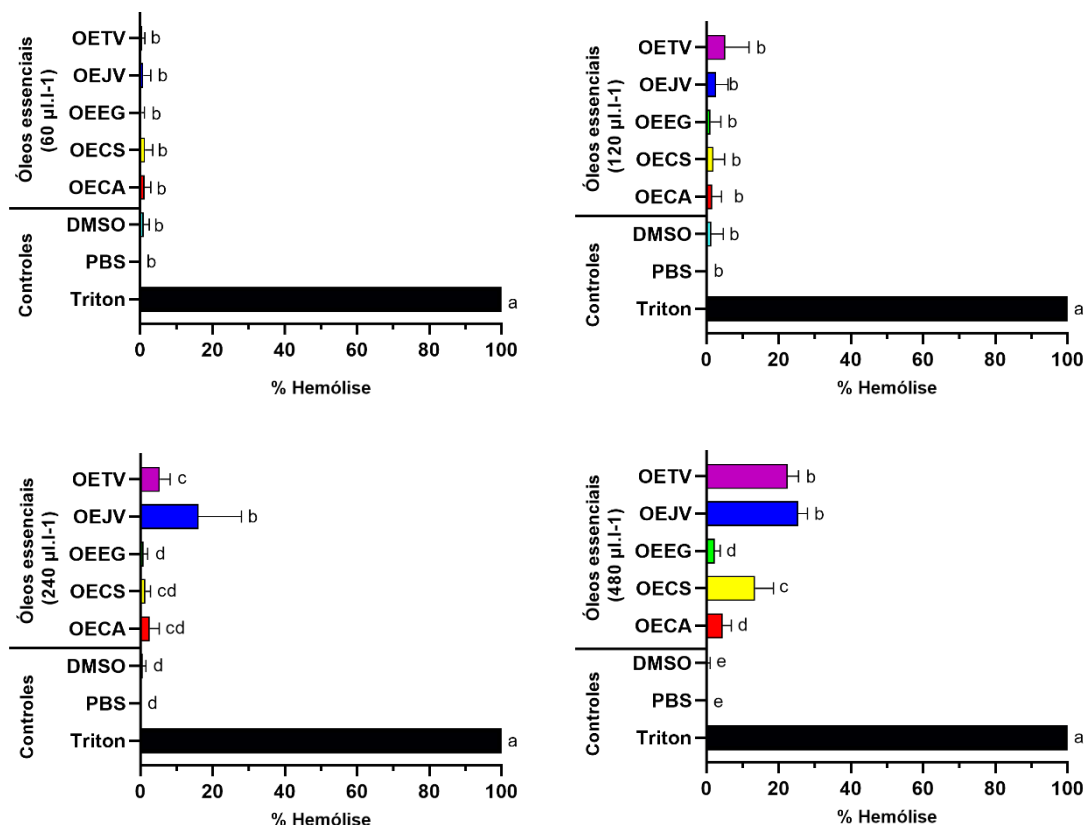


Figura 1. Efeito hemolítico dos óleos essenciais de *Citrus aurantifolia*-OECA, *Cupressus sempervirens*-OECS, *Eucalyptus globulus*-OEEG, *Juniperus virginiana*-OEJV e *Thymus vulgaris*-OETV em diferentes concentrações (60, 120, 240 e 480 µl.l⁻¹) contra eritrócitos de tilápia-do-Nilo. Letras diferentes indicam diferença entre % de lise ($p < 0,05$).

3.2 Embriotoxicidade

Durante a realização do teste não foi observada mortalidade significativa nos tratamentos controle negativo (meio E3) e controle de solvente (DMSO 0,1%), sendo demonstrado a não toxicidade do solvente adotado para a solubilização dos óleos essenciais. A toxicidade aguda dos óleos essenciais demonstrou que os embriões expostos a concentrações de OECA e OETV superiores a 25 mg.l⁻¹ e OECS a 100 mg.l⁻¹ apresentaram letalidade significativa, diferente do grupo controle negativo (meio E3). Em todas as doses testadas de OEEG não foi verificada mortalidade dos embriões. A mortalidade acumulada para cada concentração dos óleos essenciais testados pode ser verificada na Figura 2. Com base nos resultados encontrados neste teste de toxicidade foram calculados os

valores de CL50 (96h) de 35,35 mg.l⁻¹ para OECA, 62,57 mg.l⁻¹ para OECS e 19,95 mg.l⁻¹ para OETV (Fig. 3).

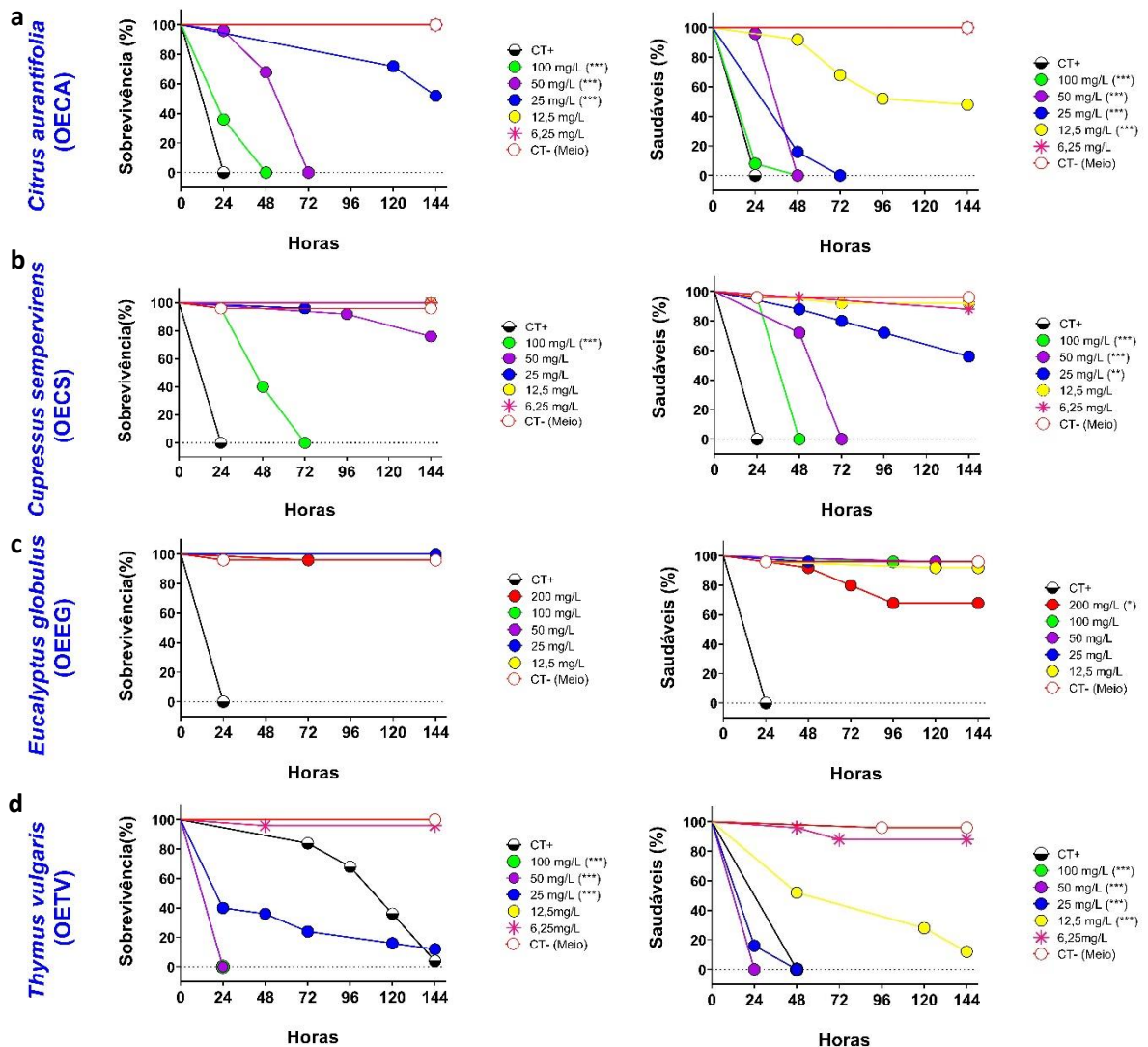


Figura 2. Gráfico de sobrevivência relatando a porcentagem de sobrevivência de embriões e embriões saudáveis expostos a suas respectivas concentrações de (a) OECA, (b) OECS, (c) OEEG e (d) OETV por 144 hpf, comparados com controle negativo (meio E3). Para analisar os resultados, Log-rank Statistical Test (Mantel-Cox) foi realizado comparando todos os grupos com o controle de meio E3. O *p* valor foi corrigido pela metodologia de Bonferroni, sendo (*) = *p* < 0,05; (**) = *p* < 0,001 e (***) = *p* < 0,0001.

Os efeitos teratogênicos, representados por embriões com malformações ou mortos, podem ser vistos na figura 2. Em OECA e OETV não foram observados efeitos teratogênicos apenas nos embriões expostos à dose de 6,25 mg.l⁻¹, enquanto em OECS também não foi possível observar efeitos na dose de

12,5 mg.l⁻¹. Alterações como edema de saco vitelínico, edema de pericárdio, hemorragia no saco vitelínico, má absorção do vitelo e atraso no desenvolvimento foram observados nos embriões expostos a esses óleos, enquanto o encurtamento do corpo e duplicação/deformação da nadadeira caudal foi verificado apenas nos embriões expostos a OECA (Figura 4). Apenas na dose de 200 mg.l⁻¹ foi possível verificar efeitos teratogênicos nos embriões expostos a OEEG, sendo estes restritos ao atraso na inflagem da bexiga natatória.

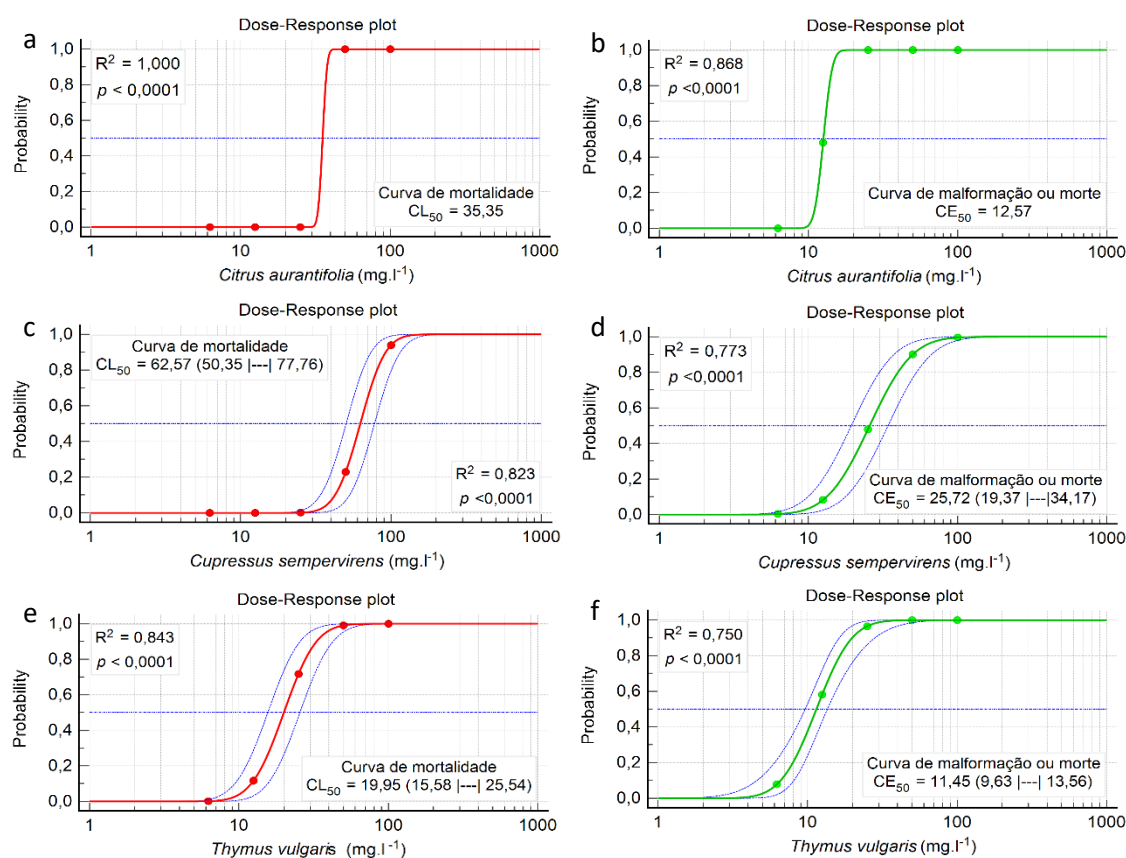


Figura 3. Curvas dose-resposta mostrando as porcentagens de mortalidade ou malformação e mortes de embriões expostos as doses de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg.l⁻¹ de OECA (a/b), OECS (c/d) e OETV (e/f). As curvas vermelhas representam modelos ajustados por Regressão Probit da mortalidade dos embriões com intervalo de confiança de 95% (curvas tracejadas em azul), enquanto as curvas verdes representam modelos ajustado para ocorrência de malformação e morte de embriões. As linhas horizontais representam as CL50 ou CE50 para os óleos testados.

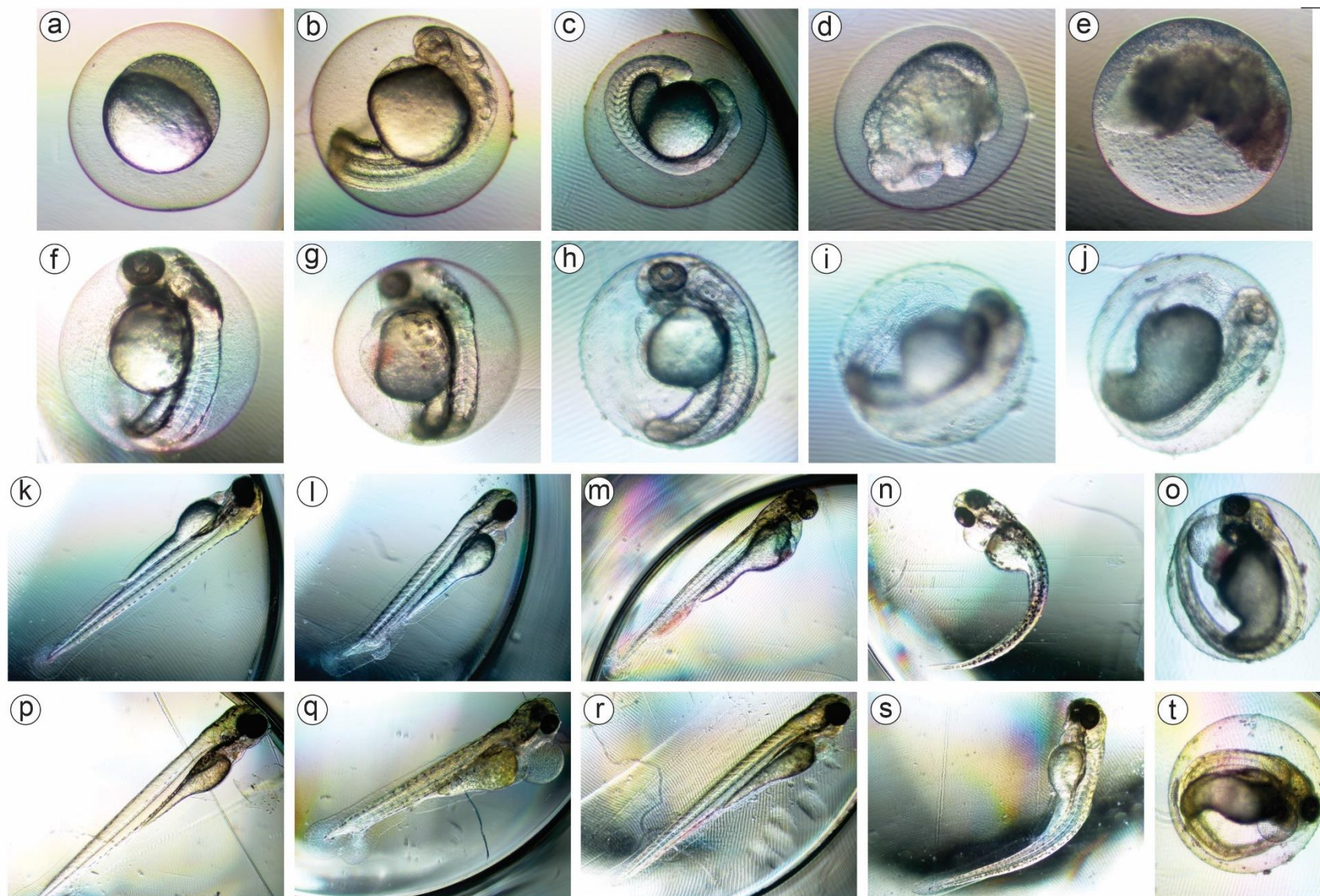


Figura 4. Fotomicrografias de embriões e larvas de Zebrafish (*Danio rerio*) durante a realização do teste de embriotoxicidade; (a) embrião após 2 h de exposição apresentando desenvolvimento normal (4 horas pós fertilização - hpf); (b) embrião 24 hpf apresentando desenvolvimento normal evidenciando região posterior com olhos, otólito, cerebelo e teto optico, cavidade pericardial e saco vitelínico normais e com cauda livre; (c) embrião 24 hpf apresentando atraso no desenvolvimento do globo ocular, otólito e cerebelo, além de apresentar cauda ligada ao saco vitelínico; (d) embrião morto durante a diferenciação corporal; (e) embrião morto antes do inicio da diferenciação das regiões do corpo (coagulado); (f) embrião 48 hpf apresentando desenvolvimento e morfologia normal; (g) embrião 48 hpf apresentando edema de saco vitelínico e área de congestão; (h) embrião 48 hpf apresentando edema de pericárdio e congestão na cauda; (i) embrião 48 hpf apresentando duplicação de nadadeira caudal; (j) embrião 48 hpf apresentando edema de pericário e saco vitelínico deformado; (k) larva 72 hpf eclodida apresentando desenvolvimento e morfologia normal; (l) larva 72 hpf apresentando deformação da cauda e edema de pericárdio; (m) larva 72 hpf eclodida apresentando edema de pericário e saco vitelínico além de congestão na cauda e saco vitelínico; (n) larva 72 hpf eclodida apresentando edema de pericárdio e curvatura corporal (“C shape”); (o) larva 72 hpf não eclodida apresentando edema de pericárdio e deformação no saco vitelínico; (p) larva 96 hpf eclodida apresentando desenvolvimento e morfologia normal; (q) larva 96 hpf eclodida apresentando edema de pericárdio e saco vitelínico, saco vitelínico deformado e nadadeira caudal duplicada; (r) larva 96 hpf eclodida apresentando edema de pericárdio, atraso na absorção de vitelo e congestão na cauda; (s) larva 96 hpf eclodida apresentando escoliose e atraso no desenvolvimento caracterizado pelo grande volume de conteúdo no saco vitelínico; (t) larva 96 hpf não eclodida apresentando escoliose, edema de pericário e atraso na absorção de vitelo.

3.3 Eficácia de óleo essencial de *Eucalyptus globulus* contra tricodinídeos

Após o tratamento, foi verificado que nos grupos controle e controle de solvente houve o aumento do número médio de parasitos por peixes em relação ao número inicial, entretanto não havendo diferença significativa entre os dois grupos. A utilização de OEEG reduziu a carga parasitária após os tratamentos, independente das doses testadas conforme pode ser visualizado na Tabela 2.

Durante a realização do experimento houve morte de apenas 1 peixe do grupo OEEG 60 mg.l⁻¹, ocorrendo horas após a primeira exposição. Alterações comportamentais como agitação e aumento de batimento opercular durante o período de exposição de OEEG foram verificadas em todas as doses testadas, além do escurecimento da pele. No grupo controle de solvente (DMSO 0,1%) não foi observado nenhuma alteração comportamental nos peixes expostos ao composto.

Tabela 2. Valores médios do número de tricodinídeos por peixe e porcentagem de eficácia após o tratamento com óleo essencial de *Eucalyptus globulus* (OEEG) em juvenis de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*.

Tratamentos	Número de parasitos	Eficácia (%)
Controle	386,1 ± 163,4 a	-
DMSO 0,1%	311,4 ± 124,1 a	19,3
OEEG 40 mg.l ⁻¹	116,7 ± 127,6 b	69,8
OEEG 60 mg.l ⁻¹	122,4 ± 61,0 b	68,3
OEEG 80 mg.l ⁻¹	100,8 ± 49,6 b	73,9

Valores seguidos por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

4 Discussão

No Brasil há uma grande necessidade de descobertas ou validação de moléculas para uso na aquicultura. Atualmente, existem apenas dois produtos antiparasitários licenciados para uso em peixes, um produto homeopático e um quimioterápico a base de sulfanilamida e verde de malaquita; sendo este último restrito a peixes ornamentais (SIPEAGRO, 2023).

Estudos relatando citotoxicidade *in vitro* de óleos essenciais com células de peixes são escassos. Assane et al., (2020) avaliando a atividade hemolítica de diversos óleos essenciais verificou que OECS a 1% (10ml.l⁻¹) ou menos não ocasionou lise em eritrócitos de tilápia-do-Nilo, demonstrando citotoxicidade nas doses de 2% (20ml.l⁻¹) e 4% (40ml.l⁻¹). Em contrapartida OEEG e OETV ocasionaram lise dos eritrócitos nas doses a partir de 0,0625% (625 µl.l⁻¹). Apesar das doses testadas serem superiores ao avaliado no presente estudo, é possível verificar uma diferença, sendo possível observar lise em eritrócitos ocasionada pelos mesmos óleos essenciais em doses menores. A composição química de OECS e OEEG foram iguais em ambos os trabalhos, diferindo apenas a composição do OETV em que Assane et al. (2020) verificou que continha 40,4 % de timol, 34,0% p-cimeno, 6,7% linalol e 6,6% carvacrol, enquanto o OETV do presente estudo apresentou 53,3% timol, 20,8 p-cimeno, 8,0% linalol e 8,9% carvacrol.

Powers et al., (2020) avaliando efeitos citotóxicos de óleos essenciais comerciais em duas linhagens celulares de câncer de mama verificou citotoxicidade a partir de OECA, OECS e OEJV, enquanto OETV não apresentou efeito citotóxicos. Estes achados evidenciam a necessidade de complementação por outros testes toxicológicos para validar os efeitos dos compostos analisados, principalmente pela variação das respostas de cada tipo celular ou organismos.

A utilização de teste de embriotoxicidade com zebrafish para avaliação de óleos essenciais vem crescendo nos últimos anos, sendo relatado por Ferraz et al. (2022) que a maioria dos estudos em peixes sobre a toxicidade de óleos essenciais e extratos vegetais utilizam esta espécie. No presente estudo não foram observados efeitos de toxicidade ou teratogenia nos embriões expostos ao solvente DMSO 0,1%, estando de acordo com dados disponíveis na literatura (Huang et al., 2018; Hoyberghs et al., 2020, 2021; Thitinarongwate et al., 2021).

Yamada et al. (2019) verificaram níveis variados de toxicidade de diferentes extratos de *Citrus tachibana*, sendo encontradas altas doses de extratos aquosos da polpa e flavedo que não ocasionaram mortalidade dos embriões de Zebrafish, sendo elas 5000 e 2000 µg.ml⁻¹ respectivamente. Em contrapartida, os extratos obtidos usando acetona e álcool a partir do flavedo

apresentaram forte toxicidade, ocasionando a morte de 100% dos embriões nas doses de 10 e 20 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Este fator pode estar relacionado com a capacidade de extração de compostos orgânicos pelos solventes usados, como por exemplo o limoneno que geralmente é o composto mais abundante em extratos a partir de cascas de Citrus. Em zebrafish adultos, baixa toxicidade foi relatada em exposição crônica a OECA, sendo observada mortalidade de 10% dos animais após 50 dias de exposição na dose de 1900 $\mu\text{g}.\text{l}^{-1}$ (Silva et al., 2023).

Efeito embriotóxico foi verificado com a exposição de embriões de zebrafish a OECS (Akermi et al., 2022), sendo constatado um aumento significativo na mortalidade quando expostos a concentrações acima de 6,0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ além da ausência de embriões viáveis quando expostos a 8,0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, com uma CL50 de 6,6 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Estes dados mostram um efeito embriotóxico superior ao verificado no presente estudo, em que somente houve mortalidade nos embriões expostos a 100 $\text{mg}.\text{l}^{-1}$ de OECS e efeitos teratogênicos nas doses acima de 25 $\text{mg}.\text{l}^{-1}$, além da CL 50 (96h) obtida de 62,57 $\text{mg}.\text{l}^{-1}$, apesar da composição semelhante entre os óleos (38,47% α -pineno, 25,14% δ -3-careno e 5,84% limoneno usado por Akermi et al., 2022).

O principal composto presente no OEEG é 1,8 cineol, composto este que apresenta uma baixa toxicidade aguda a *Poecilia reticulata*, sendo observados valores de CL50 (24h) de 1701,93 $\text{mg}.\text{l}^{-1}$ em machos e 3997,07 $\text{mg}.\text{l}^{-1}$ para fêmeas adultas (Bullangpoti et al., 2018). Da mesma forma, baixa toxicidade foi verificada em *Oncorhynchus mykiss* quando submetidos a banhos rápidos (10 min) a altas doses de OEEG para a indução de anestesia (Yigit et al., 2022). Dados estes que sustentam as observações obtidas pelo teste de embriotoxicidade de OEEG do presente estudo em que não houve mortalidade em nenhuma dose avaliada, sendo verificado apenas atraso na inflagem da bexiga natatória das larvas expostas a concentração de 200 $\text{mg}.\text{l}^{-1}$.

No presente estudo, a exposição de embriões as doses de 25, 50 e 100 $\text{mg}.\text{l}^{-1}$ de OETV ocasionou mortalidade significativa, sendo encontrado CL50 96h de 19,95 $\text{mg}.\text{l}^{-1}$. Polednik et al. (2018) observaram mortalidade de 100% dos embriões expostos a 0,005% de OETV em 24 horas e 23% de mortalidade em 72 hpf quando expostos a 0,001% de OETV, além de 20, 37 e 78% de embriões com

teratogenia nesta mesma dose. As principais alterações observadas foram edema do pericárdio e atraso no desenvolvimento percebido pela diminuição de pigmentação e saco vitelínico com tamanho e formato irregular. O timol, principal constituinte do OETV, apresentou efeito tóxico nas doses de 25, 50 e 100 μM , com declínio na sobrevivência de forma dose-dependente, sendo observada CL50 para o timol em embriões de zebrafish de 42,35 μM (Krishnan et al., 2019).

Alguns extratos herbais apresentam eficácia contra tricodinídeos em peixes relatados na literatura, como extrato de *Allium sativum* (Chitmanat et al., 2005; Aboud, 2010; Abd El-Galil e Aboelhadid, 2012), extrato de *Terminalia catappa* (Chitmanat et al., 2005), extrato hidroalcolico de *Zataria multiflora* (Bazari et al., 2021) e *Zingiber officinale* (Abo-Esa, 2008). Entretanto, *E. globulus* tem se destacado pelo potencial antimicrobiano contra bactérias patogênicas de peixes (Mahmoodi, et al., 2012; Roomiani et al., 2013; Park et al., 2016; Kacániová, et al., 2018; Gholipourkanani et al., 2019). Dessa forma, a atividade antiparasitária de OEEG contra tricodinídeos demonstra ser mais uma possibilidade a ser explorada.

A diferença verificada na eficácia dos óleos essenciais em teste *in vitro* e *in vivo* pode ser por diversos fatores. No teste *in vitro* os parasitos são lavados para retirar o excesso de muco do hospedeiro fazendo que a solução teste atinja o parasito de forma direta, enquanto, no teste *in vivo*, o muco corporal do próprio hospedeiro pode atuar como uma barreira dificultando o acesso da solução testada ao parasito. Outro fator que pode influenciar é o fato em que no teste *in vitro* são quantificados os parasitos mortos na análise em microscopia, em contrapartida, no teste *in vivo* os parasitos que permanecem aderidos ao corpo do hospedeiro são coletados e quantificados, sendo considerados mortos somente aqueles que desprendem da superfície do peixe, situação esta que pode levar a quantificação de parasitos mortos que permanecem aderidos como exemplares vivos na análise.

Apesar dos resultados promissores verificados na eficácia de OEEG em tricodinídeos no teste *in vivo*, estes resultados não são suficientes para o controle deste grupo de parasito. Por serem protozoários que se multiplicam por fissão binária e apresentarem ciclo de vida rápido (Lom e Dykova, 1992), em poucos

dias a infestação pode ser reestabelecida a partir de poucos exemplares diminuindo a efetividade do tratamento na redução do prejuízo ao hospedeiro. Substâncias ou formas de aplicação que garantam um mínimo de efetividade de controle acima de 95% devem ser preconizados neste tipo de situação, conforme verificado com o uso de formol (Valladão et al., 2016).

A partir do presente estudo foi possível elucidar efeitos toxicológicos de óleos essenciais contra eritrócitos de tilápia-do-Nilo e embriões de zebrafish, sendo que, OEEG demonstrou-se promissor no controle de tricodinídeos (68,3-73,9% de eficácia) com baixa atividade hemolítica e sem efeitos embriotóxicos evidentes indicando ser um produto seguro para a aquicultura. Apesar dos resultados promissores, mais estudos com este óleo essencial devem ser realizados para refinar as condições de tratamento como a utilização de compostos do OE de forma individualizada, podendo melhorar a eficácia contra tricodinídeos.

5 Referências Bibliográficas

- Abd El-Galil, M. A. A., Aboelhadid, S. M., 2012. Trials for the control of trichodinosis and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. Vet. Parasitol., 185(2-4), 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.035>
- Abdelkhalek, N. K., El-Adl, M. A., Salama, M. F., Elmishmishy, B., Ali, M. O., El-Ashram, A., Hamed, M. F., Al-Araby, M. A., 2018. Molecular identification of *Trichodina compacta* Van As and Basson, 1989 (Ciliophora: Peritrichia) from cultured *Oreochromis niloticus* in Egypt and its impact on immune responses and tissue pathology. Parasitol. Res., 117, 1907-1914. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5883-x>
- Abo-Esa, J. F., 2008. Study on some ectoparasitic diseases of catfish, *Clarias gariepinus* with their control by ginger, *Zingiber officiale*. Mediterr. Aquac. J., 1(1), 1-9. <https://doi.org/10.21608/maj.2008.2658>

Aboud, O. A., 2010. Application of some Egyptian medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. and *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Researcher, 2(10), 12-16.

Ahmad, A., Khan, A., Manzoor, N., Khan, L. A., 2010. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. Microb. Pathog., 48(1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2009.10.001>

Akermi, S., Smaoui, S., Elhadeb, K., Fourati, M., Louhichi, N., Chaari, M., Mtibaa, A. C., Baanannou, A., Masmoudi, S., Mellouli, L., 2022. *Cupressus sempervirens* essential oil: exploring the antibacterial multitarget mechanisms, chemcomputational toxicity prediction, and safety assessment in zebrafish embryos. Molecules, 27(9), 2630. <https://doi.org/10.3390/molecules27092630>

Akermi, S., Smaoui, S., Elhadeb, K., Fourati, M., Louhichi, N., Chaari, M., Mtibaa, A. C., Baanannou, A., Masmoudi, S., Mellouli, L., 2022. *Cupressus sempervirens* essential oil: exploring the antibacterial multitarget mechanisms, chemcomputational toxicity prediction, and safety assessment in zebrafish embryos. Molecules, 27(9), 2630. <https://doi.org/10.3390/molecules27092630>

Assane, I. M., Valladão, G. M., Pilarski, F., 2021. Chemical composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of selected plant-derived essential oils against fish pathogens. Aquac. Res., 52(2), 793-809. <https://doi.org/10.1111/are.14935>

Bazari, M. S., Masoumzadeh, M., & Jalilpour, J., 2021. Anti-parasitic effects of *Zataria multiflora* extract to eliminate the *Trichodina* parasite and its effect on blood parameters of Persian sturgeon. J. Aquac. Dev.14(4), 17-28.

Bullangpoti, V., Mujchariyakul, W., Laksanavilat, N., Junhirun, P., 2018. Acute toxicity of essential oil compounds (thymol and 1, 8-cineole) to insectivorous guppy, *Poecilia reticulata* Peters, 1859. Agric. Nat. Resour., 52(2), 190-194. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.06.011>

Chitmanat, C., Tongdonmuan, K., Nunsong, W., 2005. The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. Songklanakarin J. Sci. Technol, 27(Suppl 1), 359-364.

Ferraz, C. A., Pastorinho, M. R., Palmeira-de-Oliveira, A., Sousa, A. C., 2022. Ecotoxicity of plant extracts and essential oils: A review. *Environ. Pollut.*, 292, 118319. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118319>

Gholipourkanani, H., Buller, N., Lymbery, A., 2019. *In vitro* antibacterial activity of four nano-encapsulated herbal essential oils against three bacterial fish pathogens. *Aquac. Res.*, 50(3), 871-875. <https://doi.org/10.1111/are.13959>

Hoyberghs, J., Bars, C., Ayuso, M., Van Ginneken, C., Foubert, K., Van Cruchten, S., 2021. DMSO concentrations up to 1% are safe to be used in the zebrafish embryo developmental toxicity assay. *Front. Toxicol.*, 3, 804033. | <https://doi.org/10.3389/ftox.2021.804033>

Hoyberghs, J., Bars, C., Pype, C., Foubert, K., Hernando, M. A., Van Ginneken, C., Ball, J., Van Cruchten, S., 2020. Refinement of the zebrafish embryo developmental toxicity assay. *MethodsX*, 7, 101087. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101087>

Huang, Y., Cartlidge, R., Walpitagama, M., Kaslin, J., Campana, O., Wlodkowic, D., 2018. Unsuitable use of DMSO for assessing behavioral endpoints in aquatic model species. *Sci. Total Environ.*, 615, 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.260>

Jerônimo, G. T., Ventura, A. S., Pádua, S. B. D., Porto, E. L., Ferreira, L. C., Ishikawa, M. M., Martins, M. L., 2020. Avaliação parasitológica em híbridos de peixes Serrasalminidae cultivados no Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 29, e012920. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120200084>

Kačániová, M., Klůga, A., Terentjeva, M., Kunová, S., Puchalski, C., 2018. Gram-negative microorganisms isolated from fish and their sensitivity against essential Oils. *Scient. Papers Anim. Sci. Biotechnol.*, 51(2), 115-115.

Krishnan, M., Kim, D. K., Kim, S. G., Kang, S. C., 2019. Thymol exposure mediates pro-oxidant shift by regulating Nrf2 and apoptotic events in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 65, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.11.001>

Leira, M. H., Reghim, L. S., Ciacci, L. S., Cunha, L. T., Botelho, H. A., Braz, M. S., Dias, N. P., Melo, C. C. V., 2017. Problemas sanitários das pisciculturas

brasileiras. Pubvet, 11, 538-645. <http://dx.doi.org/10.22256/PUBVET.V11N6.538-544>

Lom, J., Dykova, I., 1992. Protozoan parasites of fishes. Elsevier Science ed. p.315. ISBN 0444894349.

Mahmoodi, A., Roomiani, L., Soltani, M., Basti, A. A., Kamali, A., Taheri, S., 2012. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils and extracts from *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus*. Global Vet., 9(1), 73-79.

Martins, M. L., 2004. Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na aquicultura brasileira. Sanidade de Organismos aquáticos, 355-368.

Park, J. W., Wendt, M., Heo, G. J., 2016. Antimicrobial activity of essential oil of *Eucalyptus globulus* against fish pathogenic bacteria. Lab. Anim. Res., 32, 87-90. <https://doi.org/10.5625/lar.2016.32.2.87>

Polednik, K. M., Koch, A. C., Felzien, L. K., 2018. Effects of essential oil from *Thymus vulgaris* on viability and inflammation in zebrafish embryos. Zebrafish, 15(4), 361-371. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1519>

Powers, C. N., Osier, J. L., McFeeters, R. L., Brazell, C. B., Olsen, E. L., Moriarity, D. M., Satyal, P., Setzer, W. N., 2018. Antifungal and cytotoxic activities of sixty commercially-available essential oils. Molecules, 23(7), 1549. <https://doi.org/10.3390/molecules23071549>

Roomiani, L., Soltani, M., Akhondzadeh Basti, A., Mahmoodi, A., Taheri Mirghaed, A., Yadollahi, F., 2013. Evaluation of the chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus* against *Streptococcus iniae* the cause of zoonotic disease in farmed fish. Iran. J. Fish. Sci., 12(2), 702-716. 20.1001.1.15622916.2013.12.3.17.4

Rufli, H., Springer, T. A., 2011. Can we reduce the number of fish in the OECD acute toxicity test?. Environ. Toxicol. Chem., 30(4), 1006-1011. <https://doi.org/10.1002/etc.465>

Silva, J. F., Vieira, S. M. M., Silva, M. C. G., Santos, T. P., Andrade, A. L. C., Bastos, P. E. S., Padilha, R. M. O., Magnabosco, A. R. S., Bittencourt, T. Q. M., Melo, J. P. R., Câmara, C. A. G., Cadena, M. R. S., Cadena, P., 2023. Toxic effects of commercial and botanical pesticides on the behavioral parameters of zebrafish (*Danio rerio*). Vet. Zootec., 30. <https://doi.org/10.35172/rvz.2023.v30.1118>

SIPEAGRO - Sistema Integrado de Produtos e Estabelecimentos Agropecuários. **Ministério da Agricultura e Pecuária-MAPA**. Acessado em: 15 de agosto de 2023.

Tavares-Dias, M., 2018. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. Aquat. Living Resour., 31, 13. <https://doi.org/10.1051/alr/2018001>

Thitinarongwate, W., Mektrirat, R., Nimlamool, W., Khonsung, P., Pikulkaew, S., Okonogi, S., Kunanusorn, P., 2021. Phytochemical and safety evaluations of *Zingiber ottensii* Valetton essential oil in zebrafish embryos and rats. Toxics, 9(5), 102. <https://doi.org/10.3390/toxics9050102>

Valladão, G. M. R., Alves, L. O., Pilarski, F., 2016. Trichodiniasis in Nile tilapia hatcheries: diagnosis, parasite: host-stage relationship and treatment. Aquaculture, 451, 444-450. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.030>

Yamada, Y., Chensom, S., Yonemoto, H., Nakayama, H., Zang, L., Nishimura, N., Mishima, T., Shimada, Y., 2020. Water extract of yamato tachibana (*Citrus tachibana*) induces food intake in adult and larval zebrafish. J. Med. Food, 23(1), 65-71. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.4484>

Yigit, N. O., Metin, S., Sabuncu, O. F., Didinen, B. I., Didinen, H., Ozmen, O., Koskan, O., 2022. Efficiency of *Ocimum basilicum* and *Eucalyptus globulus* essential oils on anesthesia and histopathology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. World Aquac. Soc., 53(5), 1051-1061. <https://doi.org/10.1111/jwas.12911>

Zago, A. C., Franceschini, L., Garcia, F., Schalch, S. H. C., Gozi, K. S., Silva, R. J. D., 2014. Ectoparasites of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in cage farming in a

hydroelectric reservoir in Brazil. Ver. Bras. Parasitol. Vet., 23, 171-178.
<https://doi.org/10.1590/S1984-29612014041>

Referências - Introdução Geral

ABD EL-GALIL, Mohamed AA; ABOELHADID, Shawky 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.

BASSON, Linda; Van As J.G., 2006. Trichodinidae and other ciliophorans (Phylum Ciliophora). In: Woo, P.T.K. (Ed.), **Fish Diseases and Disorders, Volume 1 Protozoan and Metazoan Infections**. Cab International, Oxfordshire, pp. 154–182.

BOISON, Joe O.; TURNIPSEED, Sherri B. A review of aquaculture practices and their impacts on chemical food safety from a regulatory perspective. **Journal of Aoac International**, v. 98, n. 3, p. 541-549, 2015.

BOSCOLO, Wilson Rogério; HAYASHI, Carmino; MEURER, Fábio. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 539-545, 2002.

CARVALHO, Edmir Daniel. Avaliação dos impactos da piscicultura em tanques-rede nas represas dos grandes tributários do alto Paraná (Tietê e Paranapanema): o pescado, a ictiofauna agregada e as condições limnológicas. **Relatório Científico (FAPESP)**. Botucatu, SP, 2006.

COSTA, Carinne Moreira de Souza et al. Efficacy of the essential oils of *Mentha piperita*, *Lippia alba* and *Zingiber officinale* to control the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* in *Colossoma macropomum*. **Aquaculture Reports**, v. 18, p. 100414, 2020.

COSTA, Jaqueline Custódio da et al. *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v. 471, p. 72-79, 2017.

CUNHA, Jessyka Arruda da et al. The essential oil of *Hyptis mutabilis* in *Ichthyophthirius multifiliis* infection and its effect on hematological, biochemical, and immunological parameters in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **The Journal of Parasitology**, v. 103, n. 6, p. 778-785, 2017.

DAWOOD, Mahmoud AO et al. Antiparasitic and antibacterial functionality of essential oils: An alternative approach for sustainable aquaculture. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 185, 2021.

EIRAS, Jorge da Costa et al. Diversidade dos parasitas de peixes de água doce do Brasil. **Maringá: Clichetec**, p. 2380-2389, 2010.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**. Roma: FAO 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture: Towards blue transformation**. Roma: FAO 2022.

FITZSIMMONS, Kevin; MARTINEZ-GARCIA, Rafael; GONZALES-ALANIS, Pablo. Why tilapia is becoming the most important food fish on the planet. In: LIPING, Liu; FITZSIMMONS, Kevin. **Better science, better fish, better life: Proceedings of the ninth international symposium on tilapia in aquaculture**. Shanghai: AquaFish Collaborative Research Support Program, p. 9-18, 2011.

FU, Yao-Wu et al. Combined effects of Chinese medicine feed and ginger extract bath on co-infection of *Ichthyophthirius multifiliis* and *Dactylogyrus ctenopharyngodonid* in grass carp. **Parasitology Research**, v. 116, n. 7, 2017.

FURUYA, Wilson Massamitu et al. Exigência de fósforo disponível para juvenis de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 1517-1522, 2008.

HASHIMOTO, Gabriela Sayuri de Oliveira et al. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 450, p. 182-186, 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. **Pesquisa Pecuária Municipal: Produção da aquicultura, por tipo de produto**. IBGE 2022.

KHAN, Rasul A. Parasites causing disease in wild and cultured fish in Newfoundland. **Icelandic Agricultural Sciences**, v. 22, p.29-35, 2009.

MALHEIROS, Dayna Filocreão et al. Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp.(Monogenea). **Aquaculture**, v. 455, p. 81-86, 2016.

MARTINS, Mauricio Laterça et al. Protozoan infections in farmed fish from Brazil: diagnosis and pathogenesis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 1-20, 2015.

MENESES, Juliana Oliveira et al. Efficacy of *Ocimum gratissimum* essential oil against the monogenean *Cichlidogyrus tilapiae* gill parasite of Nile tilapia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 497-504, 2018.

NIZIO, Daniela Aparecida de Castro et al. Essential oils of *Varronia curassavica* accessions have different activity against white spot disease in freshwater fish. **Parasitology Research**, v. 117, n. 1, p. 97-105, 2018.

PEIXE BR. **Anuário 2023 Peixe BR da Piscicultura**: A força do peixe brasileiro, 127p. 2023.

QIN, Weiwei; WANG, Shiyao; XIA, Ping; TANG, Fahui; ZHAO, Yuanjun. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Paratrichodina africana* Kazubski and El-Tantawy, 1986 based on 18S rRNA gene data with the evolutionary hypothesis of trichodinids. **Parasitology International**, v. 94, p. 102735, 2023.

REVERTER, Miriam et al. Use of medicinal plants in aquaculture. **Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish**, p. 223-261, 2017.

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

RICO, Andreu; VAN DEN BRINK, Paul J. Probabilistic risk assessment of veterinary medicines applied to four major aquaculture species produced in Asia. **Science of the Total Environment**, v. 468, p. 630-641, 2014.

SALARO, Rodrigo Eduardo Goulart. **Atividade *in vitro* de óleos essenciais contra *Neoechinorhynchus buttnerae* de tambaqui e seus efeitos no**

hospedeiro. Dissertação (Mestrado em AQUICULTURA) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, São Paulo (2018).

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

TAVARES-DIAS, Marcos; MARTINS, Maurício Laterça. 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.

TAVECHIO, Washington Luiz Gomes; GUIDELLI, Gislaine; PORTZ, Leandro. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335-341, 2009.

UMEDA, Naoko et al. Effects of various treatments on hatching of eggs and viability of oncomiracidia of the monogenean *Pseudodactylogyrus anguillae* and *Pseudodactylogyrus bini*. **Aquaculture**, v. 253, n. 1-4, p. 148-153, 2006.

VALENTIM, D. S. S. et al. Nanoemulsion from essential oil of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae) shows *in vitro* efficacy against monogeneans of *Colossoma macropomum* (Pisces: Serrasalminidae). **Journal of Fish Diseases**, v. 41, n. 3, p. 443-449, 2018.

VALLADÃO, Gustavo Moraes Ramos et al. Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Fish Diseases**, v. 39, n. 10, p. 1143-1152, 2016.

VALLADÃO, Gustavo Moraes Ramos; ALVES, Lindomar de Oliveira; PILARSKI, Fabiana. Trichodiniasis in Nile tilapia hatcheries: diagnosis, parasite: host-satge relationship and treatment. **Aquaculture**, v. 451, p. 444-450, 2016.

VALLADÃO, Gustavo Moraes Ramos; GALLANI, Sílvia Umeda; PILARSKI, Fabiana. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 38, n. 5, p. 417-428, 2015.

ZHU, Fei. A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. **Aquaculture**, v. 526, p. 735-742, 2020.

ZIMMERMANN, Sergio; FITZSIMMONS, Kevin. Tilapicultura intensiva. IN: CYRINO, José Eurico Possebon et al. (Eds), **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**, São Paulo: TecArt, Cap.9, p. 239-266, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo abordou todas as etapas para a escolha de substância e estabelecimento de um protocolo de tratamento contra tricodinídeos em tilápia-do-Nilo. Primeiramente a composição de 13 óleos essenciais (OEs) foi determinada, uma metodologia para a realização de atividade antiparasitária *in vitro* foi estabelecida e os OEs então testados em quatro doses diferentes (60,120,240 e 480 $\mu\text{L.l}^{-1}$). Os melhores resultados contra tricodinídeos foram observados nos óleos essenciais de *Citrus aurantifolia*, *Cupressus sempervirens*, *Eucalyptus globulus*, *Juniperus virginiana* e *Thymus vulgaris*. No segundo experimento estes óleos essenciais foram analisados quanto a seguridade pelo teste de citotoxicidade e embriotoxicidade. No teste de citotoxicidade foi verificado que o OE de *J. virginiana* ocasionou um maior percentual de lise nos eritrócitos de tilápia-do-Nilo com 16,08% e 25,415 nas doses de 240 e 480 $\mu\text{L.l}^{-1}$ respectivamente. OE *E. globulus* (OEEG), apresentou os melhores resultados no teste de embriotoxicidade, não sendo observadas mortalidades nos embriões de zebrafish expostos a doses até 200 mg.l^{-1} , sendo apenas observadas alterações em 32% das larvas oriundas desta exposição. Por apresentar efetividade contra tricodinídeos no teste *in vitro* e melhor resultado nos testes de citotoxicidade e embriotoxicidade, OEEG foi utilizado no teste de eficácia *in vivo* em que juvenis de tilápia-do-Nilo naturalmente infestados com tricodinídeos foram tratados com este OE nas doses de 40,60 e 80 mg.l^{-1} . Nesta última etapa, valor de eficácia de 73,9% foi verificada na maior dose de exposição (80 mg.l^{-1}). Apesar dos resultados promissores, a efetividade no controle dos tricodinídeos verificada não é suficiente para a utilização como tratamento em ambientes de cultivo devido as características de reprodução deste grupo de parasitos. Dessa forma, como perspectivas futuras, deverão ser analisados individualmente os compostos dos óleos essenciais com melhores resultados a fim de elucidar o componente responsável pela resposta do OE, bem como estabelecer condições em que a efetividade no controle dos parasitos seja melhorada, como ajustes no tempo e dose utilizada.