

Jaqueline Inês Alves de Andrade

Efeito do extrato acetônico de sementes de *Bixa orellana* em juvenis de tambaqui, *Collossoma macropomum* infectados por patógenos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Doutora em Aquicultura.

Orientador: Dr. Maurício Laterça Martins

Coorientadora: Dra. Elizabeth Gusmão Affonso

Florianópolis/SC
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Andrade, Jaqueline Inês Alves

Efeito do extrato acetônico de sementes de *Bixa orellana* em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* infectados por patógenos / Jaqueline Inês Alves Andrade ; orientador, Maurício Laterça Martins ; coorientadora, Elizabeth Gusmão Affonso. - Florianópolis, SC, 2015.

97 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. *Colossoma macropomum*. 3. Extrato de planta. 4. *Aeromonas*. 5. *Monogenea*. I. Martins, Maurício Laterça. II. Affonso, Elizabeth Gusmão. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Efeito do extrato acetônico das sementes de *Bixa orellana* em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* infectados por patógenos

Por

JAQUELINE INÊS ALVES DE ANDRADE

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

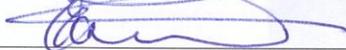


Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:



Dr. José Luiz Pedreira Mourão – *Orientador*



Dr. Evoy Zaniboni Filho



Dr. Felipe do Nascimento Vieira

Dr. Jonas Cunha Espíndola

Dr. Robert Lenoçh



Dr. Rosendo Augusto Yunes

Dedico
A minha família,
em especial a minha mãe, Darci Andrade e ao João Rosche.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem sua bênção nada seria possível para realizar esse trabalho diante de tantas dificuldades;

A minha grande família, em especial a minha mãe Darcy Andrade, ao João Rosche e Fernanda Melo pela confiança e apoio incondicional em todas as situações e decisões da minha vida;

Aos meus sobrinhos, Clarinha, Marcos, Fernando, ao meu afilhado Eduardo e ao Davi pelas alegrias durante essa jornada;

Em especial ao meu orientador Dr. Maurício Laterça Martins, pela orientação concedida, pelas oportunidades que sempre foram dadas para o meu crescimento profissional e principalmente pela paciência e compreensão;

A Dra. Cecília V. Nunez, pela orientação na parte de preparação dos extratos e estudos químicos, além da amizade, companheirismo e dedicação;

Ao Dr. José Luiz Pedreira Mouriño, pela orientação na reta final do trabalho;

A Dra. Gabriela Tomas Jerônimo, pela grande ajuda e companheirismo na reta final do trabalho;

A Dra. Fabiana Pilarski do Centro de Aquicultura da UNESP/Jaboticabal, pela concessão da cepa de *Aeromonas hydrophila*;

A empresa Chr. Hansen Brasil, pela doação das sementes de urucum para a realização do trabalho;

A Dra. Elizabeth G. Affonso por ceder o seu laboratório para a realização do trabalho;

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e em especial ao Laboratório de Fisiologia Aplicada a Piscicultura (LAFAP) e Laboratório de Biotecnologia e Bioprospecção (LABB), pelo espaço concedido e suporte para a realização deste trabalho;

Aos meus amigos e profissionais do INPA, Vanessa, Elenice, Lígia, Jandiará, Kaila, Marieta, Yara, Brenda, Karla, Carlos, Gabriel, Jefferson, Isabel, Maitê, marcos, Judá, Renan e Rafael pela amizade e companheirismo durante os experimentos. Sem a colaboração de vocês, teria sido muito difícil à realização do trabalho;

Aos funcionários do INPA Seu Atílio, Gabriel, Dona Susana, Dona Inês, Seu Roberto, pela ajuda nos trabalhos manuais, pelo cuidado, conselhos e pelos momentos de descontração e alegria;

Ao Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS), com sua grande contribuição para minha formação

profissional e pelo companheirismo e amizade de Lucas, Geovana, Maria Luiza, Jorge, Eduardo (Dudu), Monyele, Aline, Karen e Will.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, aos docentes, pela oportunidade, ensinamentos e aprendizagem;

Em especial ao Secretário da Pós-Graduação, Carlito, pelos puxões de orelha, mas principalmente pela paciência e palavras de conforto e incentivo, e ao Prof. Alex, Coordenador do pela ajuda e Compreensão;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida;

Aos projetos ADAPTA (CNPq/FAPEAM) e ao Projeto Desenvolvimento da Aquicultura e de Recursos Pesqueiros na Amazônia – DARPA, pelo suporte financeiro;

Muito obrigada a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Sem a colaboração de todos, eu não teria conseguido concluir.

RESUMO

Doenças parasitárias e bacterianas são comuns em peixes cultivados e responsáveis por altas taxas de mortalidade e perdas econômicas. Antibióticos e quimioterápicos são utilizados para o tratamento dessas doenças em peixes. Porém, sua utilização tem trazido efeitos negativos, tanto para o meio ambiente como para a saúde humana. Por isso, é importante a busca por novos medicamentos, e a utilização de produtos de origem vegetal como fonte de substâncias bioativas é uma alternativa promissora. O urucum, *Bixa orellana*, destaca-se por apresentar diversas atividades biológicas, como antioxidantes, antimicrobiana, anti-helmíntica e anti-inflamatória. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do extrato acetônico das sementes do urucum em juvenis de tambaquis, *Collossoma macropomum* infectados por patógenos. Neste trabalho foram realizados dois ensaios, a de fim de avaliar a eficácia antimicrobiana e antiparasitária sobre *Aeromonas hydrophila* e *Anacanthorus spathulatus* de tambaqui. Primeiramente, foi avaliada a eficácia *in vitro* e *in vivo* do extrato das sementes de urucum contra parasitos branquiais Monogenea e parâmetros sanguíneos de tambaqui. O segundo avaliou os parâmetros sanguíneos de tambaquis tratados com extrato das sementes de urucum após infecção por *A. hydrophila* e Monogenea. O presente estudo fornece subsídios para a substituição de quimioterápicos e antibióticos por produtos de origem vegetal, no tratamento dessas enfermidades em peixes de uma forma que minimize os impactos causados ao meio ambiente e a saúde humana.

Palavras chave: Aquicultura, *Collossoma macropomum*, Extrato de planta, *Aeromonas*, Monogenea.

ABSTRACT

Parasitic and bacterial diseases are common in farmed fish and responsible for high mortalities and economic losses. Antibiotics and chemotherapies are normally used for treating these diseases in fish. However, their use has provoked negative effects either to the environment or to human health. Therefore, the search for new medicines is important and the use of vegetal products as source of bioactive substances is a promising alternative. Annatto, *Bixa orellana*, highlights by presenting several biological activities as antioxidant, antimicrobial, anthelmintic and anti-inflammatory. The aim of this study was to evaluate the effects of acetonic extract of annatto seeds in juveniles of tambaqui, *Colossoma macropomum* infected by pathogens. Two assays were performed to evaluate the antimicrobial and antiparasitic efficacy on *Aeromonas hydrophila* and *Anacanthorus spathulatus* of tambaqui. Firstly, the *in vitro* and *in vivo* efficacy of annatto seeds extract against *Monogenea* gill parasites and blood parameters of tambaqui were studied. The second evaluated the blood parameters of tambaqui treated with annatto seeds extract after infection with *A. hydrophila* and *Monogenea*. The present study provides assistance to replace antibiotics by products of vegetal source to treat fish diseases in order to minimize the impacts caused in the environment and human health.

Key words: Aquaculture, fish, plant extract, annatto, chemical composition, *Aeromonas*, *Monogenea*, treatment.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H do extrato acetônico de sementes de *Bixa orellana* (urucum) (em DMSO-d_6 300MHz) 44

CAPÍTULO 2

.....
Figura 1 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H do extrato acetônico de sementes de *Bixa orellana* (urucum) (em DMSO-d_6 , 300 MHz) 69

Figura 2 - Eficácia anti-helmíntica in vivo do extrato acetônico das sementes de *Bixa orellana* contra *Anacanthorus spathulatus* de *Collossoma macropomum* 72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Índices parasitológicos de *Anacanthorus spathulatus* de *Colossoma macropomum* após banho com extrato acetônico de *Bixa orellana* e acetona 0,2% 46

Tabela 2 – Análise sanguínea de *Colossoma macropomum* submetidos a banhos com extrato acetônico das sementes de *Bixa orellana* e acetona 0,2 % 47

Tabela 3 – Contagem total de diferencial de leucócitos de *Colossoma macropomum* submetidos a banhos com extrato acetônico das sementes de *Bixa orellana* e acetona 0,2 % 48

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Mínima Bactericida (MBC) dos extratos das sementes de *Bixa orellana* contra *Aeromonas hydrophila*..... 68

Tabela 2 – Rendimentos obtidos pela extração de urucum, *Bixa orellana* por diferentes solventes. ^aDeterminado por UV-Vis em relação à diluição do extrato; ^bdeterminada por RMN ¹H 70

Tabela 3 - Índices parasitológicos de *Colossoma macropomum* infectados com *Aeromonas hydrophila* e *Anacanthorus spathulatus* após banhos com extrato acetônico das sementes de *Bixa orellana*..... 73

Tabela 4 - Análise sanguínea de *Colossoma macropomum* coinfectados por *Aeromona hydrophila* e *Anacanthorus spathulatus* submetidos a banhos com extrato acetônico das sementes de *Bixa orellana* e acetona 74

LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

PT – Proteína Plasmática Total

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

VCM – Volume Corpuscular Médio

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	21
1.1 A Aqüicultura mundial, brasileira e amazônica.....	21
1.2 Sobre o tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	22
1.3 Doenças na aqüicultura com ênfase na produção de tambaqui	23
1.4 Sobre o gênero <i>Aeromonas</i>	24
1.5 Sobre a Classe Monogenea	25
1.6 Sobre a utilização de produtos naturais de origem vegetal na aqüicultura	27
1.7 Sobre a espécie vegetal <i>Bixa orellana</i>	28
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. CAPÍTULO 1: Eficácia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do extrato de sementes de <i>Bixa orellana</i> sobre Monogenea parasito branquial, <i>Anacanthorus spathulatus</i> e aspectos fisiológicos de <i>Colossoma macropomum</i>	35
Resumo	37
Abstract.....	38
1.Introdução.....	39
2.Material e Métodos	40
2.1 <i>Obtenção dos peixes e dos parasitos</i>	40
2.2 <i>Teste “in vitro” do extrato das sementes de urucum</i>	40
2.2.1 <i>Preparo do extrato</i>	40
2.2.2. <i>Composição química do extrato e quantificação de bixina</i>	41
2.2.3. <i>Modelo de teste de imobilização do parasito</i>	41
2.3 <i>Banho com extrato de urucum</i>	41
2.3.1. <i>Teste de toxicidade</i>	41
2.3.2 <i>Teste “in vivo”</i>	42
2.4 <i>Análises sanguíneas e parasitológicas</i>	42
2.5 <i>Análise estatística</i>	43
3 Resultados.....	43
3.1 <i>Análise química do extrato</i>	43
3.2 <i>Teste “in vitro”</i>	44

3.3	Teste de toxicidade	44
3.4	Teste “in vivo”	44
354	Parâmetros hematológicos	45
3.6	Parâmetros bioquímicos	45
4	Discussão	49
5	Conclusão	52
6	Referências	52
5.	CAPÍTULO 2: Parâmetros sanguíneos de <i>Colossoma macropomum</i> tratados com extrato das sementes de <i>Bixa orellana</i> após infecção por <i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Monogenea</i>.....	59
	Resumo	61
	Abstract.....	62
1.	Introdução.....	63
2.	Material e Métodos	64
2.1	Obtenção dos peixes e dos parasitos.....	64
2.2	Ensaio “in vitro” do extrato das sementes de urucum	64
2.2.1	Preparo do extrato	64
2.2.2	Composição química do extrato e quantificação de bixina.....	65
2.2.3	Teste de atividade antibacteriana.....	65
2.3	Infecção experimental	66
2.4	Banho com extrato de urucum.....	66
2.4.1	Ensaio “in vivo”	66
2.5	Análises sanguíneas e parasitológicas	67
2.6	Análise estatística	68
3	Resultados	68
3.1	Teste de atividade antibacteriana e composição do extrato	68
3.2	Ensaio “in vivo”	71
3.5	Parâmetros hematológicos e bioquímicos	72
4	Discussão	75
5	Conclusão	77
6	Referências	78
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	85
8.	ANEXOS	88

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A Aquicultura mundial, brasileira e amazônica

A aquicultura é uma das atividades que mais tem crescido no mundo nos últimos anos, devido à crescente demanda por pescado como alimento (FAO, 2014). Essa atividade desempenha relevante papel econômico e social, gerando emprego e renda, inclusive em outros segmentos do Agronegócio, como as indústrias de rações, medicamentos e equipamentos (FAO, 2014).

O crescimento da aquicultura não está vinculado apenas ao aumento da sua demanda, tornou-se importante também à medida que é uma alternativa à pesca, principalmente devido a sobrepesca de várias espécies economicamente importantes e ao aumento da pressão de novas políticas ambientais que restringem cada vez mais a atividade pesqueira/extrativista (FERNANDES et al., 2010). Em 2012, a produção global aquícola foi de 90,4 milhões de toneladas, um aumento de 50,6 % em relação a 2010 cuja produção foi de 60 milhões de toneladas, sendo esse produto destinado quase inteiramente ao consumo humano (FAO, 2014).

Neste cenário, o Brasil vem cada vez mais desenvolvendo a aquicultura, sendo que em 2012 passou a ocupar a 12ª posição com uma produção de 707.461 t, e em relação a América do Sul, apenas o Chile produziu mais que o Brasil, com 1.071.421 t (FAO, 2014). Seguindo o padrão observado nos anos anteriores, a maior parcela da produção aquícola é oriunda da aquicultura continental, na qual se destaca a piscicultura continental representando 86,6% da produção total nacional.

O peixe é uma excelente fonte de proteína animal e de outros nutrientes essenciais, contribuindo para a segurança alimentar. Portanto, há uma forte campanha em nível nacional para o consumo de pescado em todo o território nacional, onde foi registrado em 2010 um consumo *per capita* de 9,75 kg/hab/ano, ou seja, um crescimento de 8% comparado ao ano de 2009 (MPA, 2011). No Amazonas, diferente dos demais estados brasileiros, a população tem no pescado sua principal fonte de proteína animal (SANTOS et al., 2006), com um alto consumo *per capita*, cerca de 33 kg/hab/ano.

Dentre as modalidades aquícolas, a região Amazônica tem sido vista como uma das regiões mais promissoras para o avanço da piscicultura no Brasil (KUBTIZA et al., 2012). Apesar da produção ainda modesta em relação às demais regiões do país, a Amazônia, sem

dúvida, possui grande potencial para a criação de peixes em cativeiro, devida suas características, tais como: maior bacia hidrográfica do mundo, a rica ictiofauna (1.500 a 5.000 espécies), clima quente o ano todo, baixa amplitude térmica nos corpos d'água (3 a 4°C), solo que propicia à construção de viveiros (VAL; HONCZARYK, 1995; ONO, 2005).

As principais espécies criadas na região são o tambaqui *Colossoma macropomum*, o matrinxã *Brycon amazonicus* e o pirarucu *Arapaima gigas* (KUBTIZA et al., 2015). Sendo o tambaqui a espécie mais produzida.

1.2 Sobre o tambaqui *Colossoma macropomum*

O tambaqui *C. macropomum*, pertencente à família Characidae é, uma das espécies mais importantes economicamente da ictiofauna Amazônica, e está distribuído nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco. Espécie de grande porte, podendo atingir até 1 metro de comprimento e pesar 30 kg na natureza, possui hábito alimentar onívoro, alimentando-se de frutos, sementes, zooplâncton e outros (ARAÚJO-LIMA; GOLDING, 1998; LOPERA-BARRERO et al., 2011).

Sem dúvida, é uma espécie com grande potencial para piscicultura devido a suas características, tais como: aceitar facilmente ração comercial e possuir crescimento rápido, alta resistência a doenças e rusticidade, suportando bem as etapas de manejo e as variações nas características físicas e químicas da água, como baixas concentrações de oxigênio dissolvido (< 1 mg/L), grandes oscilações de temperatura (18 a 35°C) e pH (3,5 a 8,5), elevados níveis de amônia tóxica (0,45 mg/L) e de nitrito (1,82 mg/L) (ISMÍÑO-ORBE et al., 2003; COSTA et al., 2004; ARAUJO-LIMA; GOMES, 2005; CHAGAS et al., 2007). Aliado a isso, apresenta grande aceitabilidade pelo mercado, uma vez, que sua carne é bastante apreciada pelo sabor, o que o torna muito atraente na região Amazônia e nos mercados externos (ONO, 2005; GOMES et al., 2010).

Todas essas características fazem do tambaqui uma das espécies principais para o desenvolvimento da piscicultura nacional. A criação dessa espécie tem se expandido por todas as regiões do Brasil, e em termos produtivos, é a segunda que mais cresceu no país, ficando atrás somente da tilápia. Atualmente é a espécie nativa mais importante da piscicultura brasileira, com uma produção que passou de 54,313 mil toneladas em 2010 para 111,084 toneladas em 2011, com destaque para a região Norte que contribuiu com 62,7 % desse total (MPA, 2013).

O mercado de Manaus é o maior centro de consumo de tabaqui, absorvendo mais de 30.000 t/ano desta espécie produzidas no AM, RR, RO e AC. Atualmente, a pesca extrativista do tabaqui no Amazonas se mantém constante, em torno de 4.000 t (SEPA, 2013), enquanto sua produção em cativeiro tem crescido a cada ano com uma produção de 16.524 t (IDAM, 2013). Esse expressivo crescimento se deve aos investimentos por parte das instituições de fomento, principalmente no campo da pesquisa, nas diversas áreas da sua cadeia produtiva (KUBITZA, 2012).

Entretanto, com a intensificação da produção de tabaqui, surge a preocupação com o aumento na ocorrência de doenças, e são vários os relatos sobre perdas excessivas de plantéis nas pisciculturas, principalmente na região Norte (GOMES et al., 2012).

Das diferentes espécies de parasitos que afetam os tabaquis, destaca-se a classe Monogenea (THATCHER, 2006). São ectoparasitos, que podem ser encontrados no corpo, nadadeiras e brânquias dos peixes (PAVANELLI et al., 2013). Os Monogenea são um grupo de grande importância para piscicultura, pois podem provocar altas taxas de mortalidades (MARTINS et al., 2002; THACHER, 2006). Outra causa de grandes perdas nos sistemas de cultivo são as bacterioses, e dentre estas, as causadas por *Aeromonas hydrophila* (PAVANELLI et al., 2013). Um fator que colabora aumentando a mortalidade dos peixes em sistemas de cultivo são as infecções mistas, uma vez que peixes infectados por parasitos, são mais suscetíveis ao desenvolvimento de bacterioses (BUSCH et al., 2003; XU et al., 2009), causando declínio ainda maior na produção.

Portanto, torna-se de grande importância a busca por medidas profiláticas, e de tratamento efetivas e seguras contra doenças causadas por Monogenea e de etiologia bacteriana em juvenis de tabaquis, principalmente as da espécie *A. hydrophila*.

1.3 Doenças na aquicultura com ênfase na produção de tabaqui

A ocorrência de doenças em animais aquáticos vem se tornando cada vez mais frequente nos países onde a aquicultura teve crescimento acelerado (PAVANELLI et al., 2013; FAO, 2012).

O aparecimento de doenças na criação de salmão do Atlântico, no Chile, as ostras na Europa, e o cultivo de camarão marinho em vários países da Ásia, América do Sul e África, tem resultado em perdas parciais ou totais na produção. O piolho marinho, *Lepeophtheirus salmonis* causou colapso populacional de salmão do Atlântico no Canadá

e no Chile (FAO, 2012) e a mancha-branca em fazendas de camarões no Brasil, no estado de Santa Catarina e na região Nordeste (COSTA et al., 2010). Em 2010, a aquicultura na China sofreu perdas na produção de 1,7 milhões de toneladas causadas por desastres naturais, doenças e poluição. Surtos de doenças praticamente eliminaram a produção aquícola do camarão marinho em Moçambique em 2011, e, na América do Sul, tem-se verificado um aumento no aparecimento de doenças, particularmente no Brasil e no Peru (FAO, 2012).

A produção nacional de tambaqui vem enfrentando problemas relacionados ao aparecimento de doenças parasitárias e bacterianas (SILVA 2001; VARELLA et al. 2003; SANTOS et al. 2013). As doenças parasitárias mais comumente relatadas para o tambaqui são causadas por várias espécies de Monogenea, infestações maciças por acantocéfalos *Neoechinorhynchus butnerae*, com perda de peso pelo hospedeiro, mixosporídeos, crustáceos copépodes e branquiúros e pelo protozoário dinoflagelado *Piscinoodinium pillulare* (MALTA et al. 2001; VARELLA et al. 2003; SANTOS et al. 2013). Sendo os Monogenea, um grave problema para a piscicultura por apresentarem altos valores de intensidade parasitária registrados em sistemas de cultivo (VARELLA et al. 2003; GOMES et al., 2012).

Em relação às bactérias isoladas de tambaqui, Pilarski et al. (2008), isolaram *Flavobacterium columnare*. Silva (2001) registrou a ocorrência de vários gêneros cujos mais representativos foram: *Aeromonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Alcaligenes* sp., *Moraxella* sp. e *Pseudomonas* sp. Contudo, na criação de peixes de água doce *A. hydrophila* é responsável por grandes perdas (BELEM-COSTA; CYRINO, 2006).

1.4 Sobre o gênero *Aeromonas*

Dentre as doenças infecciosas em peixes, as de origem bacteriana representam elevada significância patogênica em cultivo intensivo (THUNE et al., 1993). Bactérias do gênero *Aeromonas* são responsáveis por grandes perdas na piscicultura, muitas vezes aparecendo como agente primário causador de lesões ulcerativas e septicemia hemorrágica em peixes (RADU et al., 2003). As *Aeromonas* são bacilos ou cocabacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporulantes (HOLT et al., 1994). As espécies de bactérias deste grupo que causam problemas nos peixes são: *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. cavia* e *A. salmonicida*, sendo esta última espécie a única desse complexo, não móvel e patogênica obrigatória de peixes. O restante pode causar

enfermidades em outros animais ectotérmicos e em homeotérmicos, incluindo o homem (SALTON; SCHNICK, 1973).

Dentre as espécies de bactérias citadas acima, as que provocam maior mortalidade na piscicultura de água doce é a *A. hydrophila* (PAVANELLI et al., 2013). É uma bactéria tipicamente oportunista, que quando há desequilíbrio dos sistemas hospedeiro-patógeno-ambiente, podem desencadear o aparecimento de doenças (PAVANELLI et al., 2013). Fazem parte da microbiota da água, e podem atacar as brânquias, tegumento e intestino de peixes perfeitamente saudáveis, sendo especialmente abundantes em águas eutrofizadas (PAVANELLI et al., 2013). Geralmente os sinais clínicos de infecções causadas por *A. hydrophila* em peixes são: perda de apetite, perda de equilíbrio, lesões epidérmicas (despigmentação, necrose da pele, úlceras com exposição da musculatura), hiperplasia do fígado, baço e dos rins, dentre outras (HARIKRISHNAN et al., 2003; SILVA et al., 2012).

Por estarem presentes naturalmente no ambiente aquático e fazerem parte da microbiota natural dos peixes, torna-se difícil seu controle. Para o tratamento de doenças de etiologia bacteriana, estão disponíveis antibióticos e outros quimioterápicos (PAVANELLI et al., 2013). Porém, o uso desses produtos pode trazer efeitos negativos, tais como: resistência bacteriana ao princípio ativo da droga, imunossupressão, acúmulo de resíduos nos tecidos e poluição do meio ambiente (MAXIMIANO et al., 2005). Assim, se torna necessário a implementação de medidas profiláticas e de tratamento contra as doenças de etiologia bacteriana, que minimizem tais efeitos colaterais causados pelos tratamentos utilizados comumente.

1.5 Sobre a Classe Monogenea

Doenças de origem parasitária produzem elevada significância patogênica na criação intensiva, pois podem provocar altas taxas de mortalidade causando perdas para os produtores (PAVANELLI et al., 2013). Dentre as espécies de parasitos que afetam os sistemas de criação, destacam-se os Monogenea (THATCHER, 2006; MARTINS et al., 2008). Pertencentes ao filo Platyhelminthes e classe Monogenea, são ectoparasitos, que podem ser encontrados no corpo, nadadeiras, brânquias, fossas nasais e na cavidade oral dos peixes (PAVANELLI et al., 2013). Além desses locais, podem ser encontrados atuando como endoparasitos, habitando o estômago, ductos intestinais e ureteres (THACHER, 2006; JERÔNIMO; SPECK; MARTINS, 2010). Eles apresentam ciclo de vida direto (monoxeno), portanto, capazes de

multiplicar-se rapidamente em sistemas de criação de alta densidade (EIRAS; TAKEMOTO; PAVANELLI, 2010). São parasitos que quando o hospedeiro está exposto às condições estressantes podem provocar surtos epizooticos com altas taxas de mortalidade (MARTINS et al., 2002).

Dois famílias se destacam causando maiores danos para produção de peixes, Dactylogyridae e Gyrodactylidae, sendo a primeira, a mais abundante nas águas da América do Sul (THATCHER, 2006) e no Brasil (TAKEMOTO et al., 2004). Seis espécies de Monogenea foram descritas parasitando tambaquis, cinco da família Dactylogyridae: *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis*, *Linguadactyloides brinkmanni*, *Mymarothecium boegeri*, *Anacanthorus penilabiatu*s, e uma espécie da família Gyrodactylidae: *Gyrodactylus* sp. (FISCHER et al., 2003; BELMONT-JÉGU et al., 2004; COHEN; KOHN, 2005; THATCHER, 2006). Sendo as espécies de maior ocorrência *A. spathulatus*, *L. brinkmanni* e *Notozothecium* sp. (MALTA et al. 2001; VARELLA et al. 2003; THATCHER 2006).

Peixes infectados por Monogenea apresentam como sinais clínicos, aumento na produção de muco nas brânquias, hemorragias cutâneas e branquiais, lesões na pele, anorexia e emagrecimento (PAVANELLI et al., 2013). Além disso, os peixes nadam esfregando-se na parede dos tanques tentando retirar os parasitos do corpo. Contudo, nessa tentativa acabam originando lesões epidérmicas, servindo de porta de entrada para infecções secundárias, como as causadas por bactérias (ONAKA et al., 2003).

O controle desses parasitos é realizado por meio de banhos terapêuticos ou de medicamentos adicionados na ração, sendo alguns dos produtos utilizados, o mebendazol, formalina, praziquantel, sulfato de cobre, dentre outros (TAVARES-DIAS et al., 2003; PAVANELLI et al., 2013). Todavia, a utilização de alguns produtos causa alguns efeitos negativos, para os peixes e ao manipulador, além do meio ambiente onde muitas vezes são descartados.

Estudos sobre aspectos toxicológicos para determinar doses seguras e período de carência nos animais são escassos, portanto, é importante a realização de pesquisas que busquem responder essas questões. Além disso, a busca por novos medicamentos que minimizem os efeitos colaterais causados pelos quimioterápicos. E a utilização de produtos de origem vegetal como fonte de substâncias anti-helmínticas é promissora.

1.6 Sobre a utilização de produtos naturais de origem vegetal na aquicultura

As regiões que abrigam a maior diversidade de espécies são as florestas tropicais, devido às suas características favoráveis, e a floresta Amazônica se destaca por possuir a maior biodiversidade do planeta (MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI, 2015). Sendo a maior diversidade florística do mundo, apresenta várias espécies vegetais portadoras de princípios ativos com potencial terapêutico contra várias doenças, principalmente no que diz respeito a doenças causadas por agentes infecciosos (COSTA et al., 2008). Isso se torna de grande importância, visto que, os medicamentos disponíveis estão se tornando cada vez mais ineficientes, o que tem se tornando uma preocupação mundial. Esse problema afeta diversos setores da sociedade, inclusive o agronegócio, como a piscicultura, por isso, é importante buscar formas de minimizar esses efeitos negativos, através de novos medicamentos, eficientes e seguros.

Os antibióticos e quimioterápicos utilizados na aquicultura para o tratamento de doenças, tem sido criticados pelos seus efeitos negativos, tais como: resistência ao princípio ativo da droga, acúmulo de resíduos nos tecidos dos animais e poluição do meio ambiente (TAVECHIO et al., 2009). Consequentemente, o interesse pelos produtos naturais biologicamente ativos com o intuito de serem utilizados como imunoprolifáticos e no tratamento de doenças em peixes tem aumentado nos últimos anos (REVERTER et al., 2014).

Sabendo-se dos benefícios de diferentes produtos naturais utilizados como antibacterianos e antiparasitários (BRITO et al., 2009; OKPEKON et al., 2004), vários estudos têm sido realizados demonstrando que a utilização destes produtos como fonte de substâncias contra patógenos de peixes, é uma alternativa promissora. Diversos estudos demonstram a atividade antibacteriana *in vitro* de extratos, frações e substâncias purificadas de plantas contra vários patógenos de peixes (RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN 2007; OLIVEIRA et al., 2007). Indu et al. (2006) observaram que os extratos etanólicos de *Allium sativum* (alho), e aquosos de *Myristica fragrans* (noz-moscada) apresentaram atividade antibacteriana contra *A. hydrophila*. Resultados similares foram relatados por Anusha et al. (2014), utilizando extratos de *Ixora coccinea* preparados com hexano, acetato de etila e metanol. Os estudos de Hashimoto et al. (2016) mostraram a eficácia do uso de *Mentha piperita* (hortelã-pimenta) contra *Monogenea* parasitos de tilápia do Nilo, além

do tratamento não ter provocado alterações nos parâmetros hematológicos.

De modo geral, os extratos vegetais apresentam atividade antibacteriana contra importantes patógenos de etiologia bacteriana de organismos aquáticos. *Flavobacterium columnare* e *Aeromonas hydrophila* foram controlados pelos extratos metanólicos de *Cariniana legalis*, *Croton floribundus* e *Myrcia velutina* (CASTRO et al., 2008). Wei e Musa (2008), observaram que o extrato de alho foi ativo contra bactérias Gram-positivas (*Streptococcus agalactiae*) e Gram-negativas (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Edwardsiella tarda*).

Além dos estudos *in vitro*, muitos trabalhos demonstram o efeito benéfico do uso de espécies vegetais no controle de doenças infecciosas *in vivo* (HARIKRISHNAN et al., 2010; DAS et al., 2007). Dentre estas espécies vegetais, algumas agem como imunostimulantes naturais, aumentando a atividade dos mecanismos de defesa não específicos e conferindo proteção contra doenças quando adicionados à ração dos peixes (CHRISTYBAPITA et al., 2007; SAHU et al., 2007; PARK e CHOI, 2012; KUMAR et al., 2013; TANG et al., 2014).

Outra maneira de utilização dos vegetais, e que se mostram promissores no controle de doenças em peixes, são os banhos terapêuticos (HARIKRISHNAN et al., 2003; CLAUDIANO et al., 2009; TU et al., 2013; HASHIMOTO et al., 2016). Essa forma de tratamento é de grande importância, principalmente quando os animais se encontram debilitados e passam a não se alimentar, conseqüentemente, não podendo ser tratados por medicamentos adicionados a ração. Porém, um grande problema dos banhos terapêuticos, é que na maioria das vezes a água utilizada, é liberada no meio ambiente. Por isso, a utilização de produtos que possam minimizar seus efeitos negativos é de grande importância.

1.7 Sobre a espécie vegetal *Bixa orellana*

Bixa orellana, conhecida popularmente como urucum, pertence à família Bixaceae, é originária de florestas tropicais das Américas Central e do Sul (LORENZI; MATOS, 2002). Utilizada na medicina popular para higiene bucal, contra gonorreia e inflamação na garganta (LORENZI; MATOS, 2002). Apresenta ampla utilização na indústria alimentícia, pois possui a capacidade de conservar e agregar a qualidade dos alimentos (BRAGA et al., 2007). Além disso, é utilizada na substituição de corantes sintéticos devido ao seu baixo custo de produção e baixa toxicidade. (AGNER et al., 2004). Paumgarten et al.,

(2002) avaliaram a toxicidade de extratos de urucum em concentrações até 500 mg/kg de peso corporal por dia em ratas grávidas, e observaram que não houve nenhum efeito adverso sobre a mãe e o feto. Também não se observou atividade mutagênica em ratos alimentados com extrato das sementes de urucum nas concentrações de 1,330, 5,330 e 10,670 ppm, durante sete dias. (ALVES DE LIMA, et al., 2003).

Diversos estudos mostram que *B. orellana* produz diversas classes de substâncias, como por exemplo, carotenóides, flavonóides, alcalóides, entre outros, estando distribuídos em diversos órgãos vegetais (COELHO et al., 2003; BRAGA, et al., 2007). Estas classes de substâncias são responsáveis por diversas atividades biológicas, como: antioxidante, antiparasitária, antimicrobiana, dentre outras (IROBI et al., 1996; GOMES et al., 2008).

Estudos sobre a atividade antimicrobiana são importantes, visto que já foram detectados diversos microrganismos resistentes aos medicamentos comumente utilizados (AKINBOWALE et al., 2007). A literatura mostra trabalhos realizados com *B. orellana* testando sua atividade contra diversos microrganismos de interesse clínico, com resultados satisfatórios (FLEISCHER et al., 2003; BRAGA, et al., 2007; MAJOLO et al., 2013), evidenciando seu potencial contra doenças causadas por agentes etiológicos infecciosos.

As sementes de urucum são ricas em carotenóides, sendo o mais abundante a bixina, compreendendo cerca de 80% do total dos carotenóides (PRESTON; RICKARD, 1980), pigmento responsável pela coloração vermelha, e várias por atividades biológicas dentre elas antioxidante e antimicrobiana (CHISTÉ et al., 2011; MAJOLO, 2013).

Diante do exposto, *B. orellana* pode ser considerada um vegetal de escolha para testes de atividade antibacteriana e antiparasitária de interesse contra patógenos que acometem a piscicultura.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do extrato acetônico das sementes de *B. orellana* em juvenis de tambaqui infectados por patógenos. Contribuindo para a substituição do uso de antibióticos e outros quimioterápicos, por produtos naturais no tratamento de doenças infecciosas em peixes.

2 JUSTIFICATIVA

O tambaqui, *C. macropomum*, é a espécie nativa de maior importância, ficando atrás somente da tilápia. Entretanto, a intensificação da criação favorece o surgimento e a propagação de doenças por agentes infecciosos, tendo como consequência, perdas econômicas significativas. Dentre as doenças de etiologia bacteriana, *Aeromonas hydrophila* vêm adquirindo cada vez mais resistência aos antibióticos utilizados. Outro grupo que provoca grandes perdas na criação são os parasitos Monogenea. Esses parasitos causam lesões nos peixes, que servirão de porta de entrada para infecções secundárias, causadas por bactérias. Consequentemente, os peixes se tornam mais propensos à mortalidade por infecções mistas.

Antibióticos e quimioterápicos são utilizados para o tratamento dessas doenças em peixes. Porém, sua utilização traz efeitos negativos, tanto para o meio ambiente, como para a saúde humana. Por isso, é importante a busca por novos medicamentos, e a utilização de produtos de origem vegetal, como fonte de substâncias é uma alternativa que vem se mostrando promissora.

O urucum, *Bixa orellana*, destaca-se por apresentar diversas atividades biológicas, como antioxidantes, antimicrobiana, anti-helmíntica e anti-inflamatória. Por estas razões, o presente trabalho pretende avaliar a eficiência do tratamento com urucum em juvenis de tambaqui, submetidos à infecção por *A. hydrophila* e Monogenea. Com isso, pretende-se diminuir as perdas nos sistemas de criação utilizando produtos que minimizem os impactos causados ao meio ambiente e a saúde humana.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do extrato acetônico das sementes do urucum, *Bixa orellana*, em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* infectados por *Aeromonas hydrophila* e parasitados por *Monogenea*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade anti-parasitária do extrato acetônico das sementes de *B. orellana* contra parasitos *Monogenea in vitro*;
- Determinar a atividade antibacteriana do extrato acetônico das sementes de *B. orellana* contra *A. hydrophila in vitro*;
- Avaliar a toxicidade do extrato acetônico das sementes de *B. orellana* em juvenis de tambaqui;
- Avaliar a eficácia de banhos terapêuticos com extrato acetônico das sementes de *B. orellana* no controle de infecções causadas por *A. hydrophila* e *Monogenea* em juvenis de tambaqui.

CAPÍTULO 1

Eficácia *in vitro* e *in vivo* do extrato de sementes de *Bixa orellana* sobre Monogenea parasito branquial, *Anacanthorus spathulatus* e aspectos fisiológicos de *Colossoma macropomum*

In vitro* and *in vivo* efficacy of seed extract of *Bixa orellana* against monogenean gill parasite *Anacanthorus spathulatus* and physiological aspects of *Colossoma macropomum

**Jaqueline I.A. Andrade^a, Elenice M. Brasil^a, Cecilia V. Nunez^b,
Eduardo L.T. Goncalves^a, Maria L. Ruiz^a, Gabriela T. Jerônimo^{ac},
Maurício L. Martins^a**

^aLaboratório AQUOS – Sanidade de Organismos Aquáticos,
Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias (CCA),
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga
1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil

^bLaboratório LABB – Laboratorio de Bioprospecção e Biotecnologia do
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Av. André
Araújo, 2.936, Petrópolis, 69067-375, Manaus, AM, Brasil

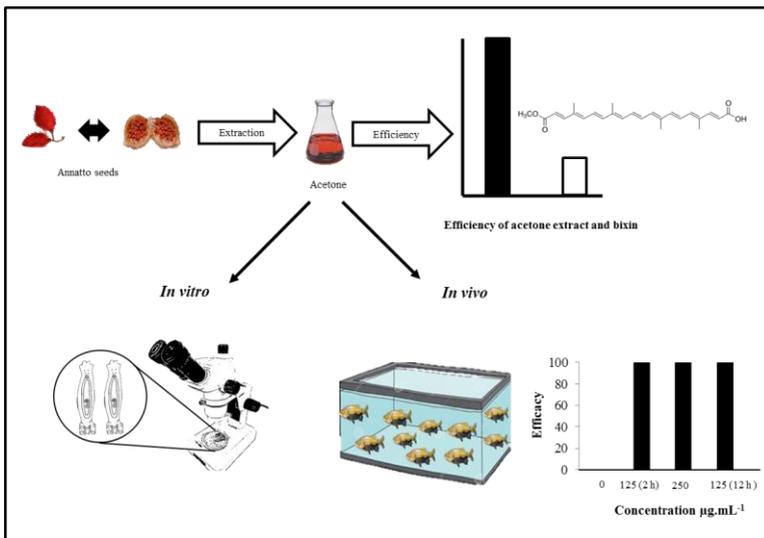
^{ac}Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Universidade Nilton
Lins/INPA, Av. Prof. Nilton Lins, 3259, 69058-030, Manaus, AM,
Brasil

Artigo submetido para *Veterinary Parasitology*

Highlights

- Infestações por monogenóides resultam em mortalidades e perdas econômicas na piscicultura.
- Tratamento com extrato vegetal é uma alternativa para o controle de doenças em peixes.
- Primeiro relato de tratamento de monogenóides com extrato das sementes de urucum *Bixa orellana* em organismos aquáticos.
- Houve 100% de eficácia do extrato acetônico das sementes de urucum contra o monogenóide *Anacanthorus spathulatus* de *Collossoma macropomum*.
- A concentração de hemoglobina, hematócrito e contagem de eritrócitos foram maiores nos peixes tratados com urucum.

Graphical Abstract



Resumo

Este estudo avaliou a utilização de banhos terapêuticos com extrato acetônico das sementes de *Bixa orellana* sobre os parâmetros hematológicos e cortisol plasmático de tambaqui *Colossoma macropomum* parasitados pelo monogenóide *Anacanthorus spathulatus*. O extrato foi analisado por ressonância magnética nuclear (RMN) e apresentou atividade anti-helmíntica *in vitro* contra os parasitos, e os peixes suportaram às concentrações avaliadas no teste de toxicidade. Com base nestes resultados, foi realizado o teste *in vivo*. Um total de 180 juvenis de tambaqui foram divididos em seis tratamentos em triplicata: peixes não tratados e não parasitados; peixes expostos a acetona 0,2 %; peixes parasitados, não tratados com o extrato; peixes tratados com 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extrato; peixes tratados com 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extrato com banho de 2 h por 2 dias consecutivos; e peixes tratados com 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extrato submetidos a um banho de 12 h. Após o último banho, análises parasitológicas e sanguíneas foram realizadas. O extrato apresentou 100% de eficácia em todas as concentrações e tempos avaliados. A concentração de hemoglobina, percentual de hematócrito e contagem de eritrócitos foram maiores nos peixes tratados com o extrato em comparação grupo controle (não tratado). Foi observada redução significativa no número de trombócitos nos peixes após o banho com acetona a 0,2% em relação ao grupo basal e 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, assim como a diminuição do número de linfócitos circulantes após banho de acetona com 0,2% e 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 12 h em relação aos peixes não tratados. Por outro lado, aumento significativo na contagem de leucócitos totais foi encontrado em peixes tratados com 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 12 h em relação a grupo basal e acetona. A glicose foi significativamente maior nos peixes tratados com o extrato e o cortisol foi significativamente maior nos peixes tratados com acetona em relação aos demais. Este é o primeiro relato sobre a utilização de sementes de urucum *B. orellana* contra parasitas monogenético de tambaqui. O modelo de estudo *in vitro* utilizado com brânquias em placas de Petri teve sucesso e pode ser implementado para diversos testes no tratamento de parasitos de peixes. O banho com extrato de urucum é um tratamento alternativo eficaz no tratamento de Monogenea. Porém, mais estudos devem ser realizados como o mecanismo de ação anti-helmíntica, isolamento de substâncias bioativas e avaliação toxicológica antes de testar sob condições de criação.

Palavras-chave: Fisiologia, fitoterápico, piscicultura, urucum, tratamento, modelo de estudo

Abstract

This study evaluated the use of therapeutic baths with acetonic extract of *Bixa orellana* seeds on the hematological parameters and plasma cortisol levels of tambaqui *Colossoma macropomum* parasitized by monogenean *Anacanthorus spathulatus*. The extract was evaluated by Nuclear Magnetic Resonance (RMN) and showed anthelmintic activity *in vitro* against the parasites, and the fish tolerated the concentrations used in the toxicity test. Based on these results, an *in vivo* test was performed. A total of 180 juveniles of tambaqui were divided in six treatments in triplicate: non-treated fish and non-parasitized; fish exposed to acetone 0.2%; non-treated fish parasitized; fish treated with 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of annatto extract; fish treated with 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for 2 h bath for two consecutive days; and fish treated with 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for a single bath for 12 h. After the last bath, parasitological and hematological analysis were performed. Annatto extract showed 100% efficacy in all concentrations and times of bath evaluated. Hemoglobin concentration, hematocrit percentage and red blood cells count were higher in treated fish than that observed in those non-treated with annatto extract. Significant decrease in thrombocyte number was observed in fish after bath with acetone 0.2% compared to basal group and 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 2 h, as well as decreased number of circulating lymphocytes in fish after bath with acetone 0.2 % and 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 12 h in relation to non-treated fish. On the other hand, significant increase in WBC count was found in fish treated with 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 12 h in relation to basal and acetone groups. Glucose was significantly higher in annatto-treated fish and cortisol was significantly higher in acetone-treated fish compared to other treatments. This is the first report on the use of annatto seeds of *B. orellana* against monogenean parasites of fish. *In vitro* study model used with gills in Petri dishes and their *in situ* observation was successful and consists in a useful tool for treating fish parasites. Annatto extract bath is an efficacious alternative for treating monogeneans. However, more studies must be carried out for better understanding of the mechanism of anthelmintic activity, isolation of bioactive substances and toxicological evaluation before testing in farming conditions.

Keywords: Physiology, phytotherapeutic, fish farming, annatto, treatment, study model

1. Introdução

Colossoma macropomum, comumente denominado tambaqui ou “chachama” é nativo da região Amazônica e a segunda espécie mais cultivada no Brasil (Kubtiza, 2015) devido à suas excelentes características para criação, além de possuir alto valor de mercado (Roubach et al., 2003). Entretanto, a intensificação da produção pode desencadear situações que causam estresse nos animais resultando em imunossupressão, surtos epizooticos e perdas econômicas na piscicultura (Carneiro et al., 2007; Gomes et al., 2012).

Dentre os patógenos que frequentemente acometem os tambaquis em sistema de criação, estão os parasitos Monogenea, principalmente da família Dactylogyridae (Varella et al., 2003). Apresentam ciclo de vida direto, se reproduzem rapidamente em condições adequadas, podendo gerar quadros graves de infestação causando mortalidade em qualquer fase da vida dos animais (Eiras et al., 2010; Jerônimo et al., 2014). Portanto, o controle desses parasitos tornou-se necessidade na piscicultura. Diversos produtos químicos como a formalina, permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio, praziquantel e mebendazol tem sido utilizados para o seu controle (Pavanelli et al., 2008; Forwood et al., 2013).

Porém, o uso contínuo e de maneira inadequada pode implicar em efeitos negativos como resistência ao princípio ativo da droga, imunossupressão, contaminação ambiental e riscos à saúde humana (Tavechio et al., 2009; Matyar et al., 2010; Lôbo et al., 2010; Suhel et al., 2011). Esse fato tem estimulado a busca por novos medicamentos, e as fontes de origem vegetal têm se mostrado promissoras na prevenção e no tratamento contra patógenos de peixes, incluindo as parasitoses (Reverter et al., 2014; Boijink et al., 2015; Bulfon et al., 2015; Hashimoto et al., 2016). Diversos estudos têm mostrado que as plantas são portadoras de substâncias com propriedades parasiticidas em peixes (Claudio et al., 2009; Wang et al., 2010; Dotta, et al., 2015, Levy et al., 2015).

Dentre as espécies vegetais estudadas com finalidade terapêutica está o urucum, *Bixa orellana*, originário de florestas tropicais das Américas Central e do Sul (Lorenzi e Matos, 2002), apresenta ampla utilização na indústria alimentícia, por sua capacidade de conservar a qualidade dos alimentos (Braga et al., 2007) e na indústria farmacêutica. As sementes possuem flavonoides, alcaloides (Fleischer et al., 2003), e são ricas em carotenoides, sendo o mais abundante a bixina, compreendendo cerca de 80% do total de carotenoides nas sementes

(Preston e Rickard, 1980). Extratos das sementes de urucum apresentam diversas atividades biológicas, como antibacteriana, antiparasitária e antioxidante. Porém, sua utilização está relacionada a patógenos de interesse clínico, e até o momento, não há nenhum relato sobre a sua utilização no controle de parasitos de peixes.

Este estudo avaliou a utilização *in vitro* e *in vivo* de banho terapêutico com extrato acetônico das sementes de *Bixa orellana* contra parasitos branquiais *Monogenea* e sua influência sobre os parâmetros hematológicos e cortisol plasmático de *C. macropomum*.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção dos peixes e dos parasitos

Juvenis de tambaqui foram obtidos de uma piscicultura comercial de Manaus, AM, Brasil. Na chegada, uma amostra de dez peixes foram anestesiados com óleo de cravo (20 mg.L⁻¹), e eutanasiados para confirmação da presença dos parasitos *Monogenea* usando microscópio de dissecação (Zeiss Stemi 2000-C, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Os peixes foram mantidos por 15 dias em tanques de 500 L em sistema estático, com aeração constante e alta densidade, a fim de promover maior nível de infestação. Estes, foram alimentados duas vezes ao dia (9:00 h e 16:00 h) até a saciedade aparente utilizando ração comercial contendo 36 % de proteína bruta (marca NUTRIPISCIS). Durante os ensaios foram medidos o oxigênio dissolvido com o auxílio de oxímetro digital YSI (modelo 55, Ohio, USA), potencial hidrogeniônico pH, temperatura e condutividade elétrica com medidor multiparâmetro YSI (modelo 63, Ohio, USA), amônia e nitrito por método colorimétrico segundo Verdouw (1978) e Boyd e Tucker (1992), respectivamente, alcalinidade e dureza segundo Boyd e Tucker (1992).

2.2. Teste “*in vitro*” do extrato das sementes de urucum

2.2.1. Preparo do extrato

As sementes de urucum foram cedidas pela empresa Chr. Hansen Indústria e Comércio Ltda, Valinhos, São Paulo. O extrato foi preparado utilizando-se acetona 100%, na proporção de 25 g de sementes por 100 mL de solvente. Para a extração utilizou-se banho de ultrassom (marca Unique, modelo USC 3300) por 20 min., e em seguida o solvente foi retirado com auxílio de rota- evaporador (marca Fisatom,

modelo 801) e armazenado em frasco âmbar em freezer a -20°C até sua utilização.

2.2.2. Composição química do extrato e quantificação de bixina

O extrato foi analisado por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 300 MHz (marca Bruker – modelo Fourier 300). A amostra levada ao RMN foi padronizada, pesada 10 mg do extrato, e diluída em 600 μL de DMSO- d_6 . O espectro foi analisado e comparado com as análises em RMN das substâncias já isoladas da espécie, visando detectar a presença em cada amostra.

Para a quantificação do teor de bixina, o extrato foi dissolvido em clorofórmio e a solução resultante teve seu volume acertado para 100 mL com o mesmo solvente. Uma alíquota de 10 mL de cada solução foi retirada e diluída até 50 mL com CHCl_3 , obtendo-se uma solução com concentração de 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, e em seguida analisada em espectrofotômetro UV-Vis. Foi determinada a concentração de bixina utilizando a expressão $A = acb$, onde A representa a absorbância da solução clorofórmica do extrato, lida no espectrofotômetro, c é a concentração de bixina na solução (g/L), b é o caminho ótico (1 cm) e a é o coeficiente de absorção da bixina em CHCl_3 (2826) no λ_{max} 470 nm descrito por Tocchini e Mercadante (2001). O rendimento de bixina foi determinado considerando-se a massa do extrato utilizada na diluição.

2.2.3. Modelo de teste de imobilização do parasito

Os tambaquis foram selecionados aleatoriamente, anestesiados e eutanasiados para coleta das brânquias. Para o teste foram retirados os três primeiros arcos branquiais de cada peixe, sendo que cada arco foi separado em placas de Petri estéril para cada concentração, em triplicata. Foram utilizadas as concentrações: 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e dois controles, um de acetona 0,2 % e o outro apenas água. Para cada concentração, 60 parasitos foram contados. As placas foram observadas a cada 15 min, e os parasitos foram considerados mortos quando detectada a ausência de movimento quando estimulados com uma agulha.

2.3. Banho com extrato de urucum

2.3.1. Teste de toxicidade

O teste de toxicidade foi realizado para determinar as concentrações do extrato utilizadas no tratamento, sem comprometer a saúde dos peixes. Foram utilizadas as concentrações de 500, 250, 125 e

62,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, com cinco peixes em cada aquário de 80 L. Foram utilizados dois controles, um com acetona 0,2 % e um somente água. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os peixes foram submetidos ao banho com o extrato por 24 h, a fim de observar o seu comportamento e mortalidade. A qualidade da água foi avaliada e os valores se mantiveram com os seguintes parâmetros: oxigênio dissolvido $6,93 \pm 0,32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pH $6,29 \pm 0,58$, temperatura $26,79 \pm 0,35 \text{ }^\circ\text{C}$, condutividade elétrica $25,65 \pm 2,04$, amônia $0,09 \pm 0,03 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, nitrito $0,03 \pm 0,02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, alcalinidade $3,12 \pm 0,65 \text{ mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ e dureza $2,92 \pm 0,77 \text{ mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$. Quando os peixes tombavam, eram imediatamente transferidos para um aquário com água limpa e o tempo registrado.

2.3.2. *Teste “in vivo”*

Um total de 180 juvenis de tambaqui ($31,4 \pm 3,12 \text{ g}$) a partir da mesma desova foram adquiridas de piscicultor local e mantidos por 30 dias em tanques circulares de 500 L antes do início dos experimentos. O desenho experimental constituiu-se de seis tratamentos, em triplicata:

- Peixes não tratados e não parasitados;
- Peixes expostos a acetona 0,2 % e parasitados;
- Peixes parasitados, não tratados com o extrato;
- Peixes parasitados tratados com 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato com banho de 2 h por 2 dias consecutivos;
- Peixes parasitados tratados com 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato com banho de 2 h por 2 dias consecutivos;
- Peixes parasitados tratados com 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato submetidos a um banho de 12 h.

Após o último banho, cinco peixes de cada repetição foram coletados para análise parasitológica e sanguínea.

2.4. *Análises sanguíneas e parasitológicas*

Os peixes foram anestesiados em solução de óleo de cravo (20 mg/L), eutanasiados e as brânquias de cinco peixes de cada repetição foram coletadas para análise parasitológica imediata, e as dos outros cinco peixes banhadas em água a 60°C e fixadas em álcool 70% para posterior identificação. A quantificação de parasitos seguiu o método de Jerônimo et al. (2011).

A eficácia foi calculada de acordo com a fórmula: $EF = \text{MNPC} - \text{MNPT} \times 100/\text{MNPC}$ (EF: eficácia, MNPC: média do número de parasitos no grupo controle, MNPT: média do número de parasitos no

grupo tratado) (Dotta et al, 2015). Prevalência, intensidade média e abundância média de parasitos foram calculados de acordo com Bush et al. (1997).

O sangue foi retirado a partir da veia caudal com seringas contendo uma gota de EDTA a 10% e utilizado para determinação do percentual de hematócrito pelo método de micro-hematócrito e contagem de eritrócitos (RBC) em câmara de Neubauer após diluição 1:200 em solução de Natt e Herrick (1952). A concentração de hemoglobina foi determinada por espectrofotometria utilizando kit comercial (Labtest). Os índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados de acordo com Ranzani-Paiva et al. (2013). O plasma sanguíneo obtido por centrifugação do sangue foi destinado à determinação da glicose plasmática, proteínas totais e colesterol por método colorimétrico em espectrofotômetro utilizando um kit comercial (In Vitro). O cortisol plasmático foi determinado pelo método de Elisa, com kit comercial (Human).

2.5. Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) usando o programa STATISTICA 8.0. As médias entre os tratamentos foram comparados pelo teste Tukey a 5% de significância.

3. Resultados

3.1. Análise química do extrato

As análises de RMN e em espectrofotométricas de UV-Vis confirmaram a presença da substância bixina (Figura 1), e seu teor de 49 % por grama de extrato, respectivamente.

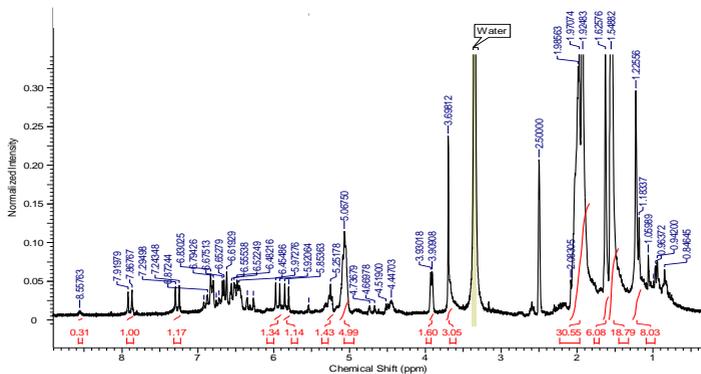


Figura 1: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H do extrato acetônico de sementes de *Bixa orellana* (urucum) (em DMSO- d_6 , 300 MHz).

3.2. Teste “in vitro”

O efeito do extrato foi evidente após a primeira hora de exposição, os parasitos começaram a absorver o extrato apresentando inchaço e movimentos lentos. As concentrações mais eficientes para causar 90% de mortalidade nos parasitos foram 500 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no período de 2 h e 3 h, respectivamente. Na concentração 125 e 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, não houve mortalidade no período de 4 h, porém os parasitos apresentaram motilidade diminuída. Parasitos expostos à água e acetona 0,2% começaram a morrer após 6 h.

3.3. Teste de toxicidade

Após a adição do extrato os peixes apresentaram agitação em todas as concentrações, seguida de subida a superfície do aquário permanecendo parados. Nas concentrações de 500 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, os peixes começaram a perder o movimento após exposição de 1 h e 3 h, respectivamente. Nas demais concentrações, os peixes permaneceram sem perda de movimento por mais de 24 h.

A partir dos resultados dos testes de toxicidade, as doses terapêuticas foram definidas como 125 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em banhos de 2 h por dois dias consecutivos, e uma concentração de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em um banho por 12 h.

3.4. Teste “in vivo”

A partir dos resultados dos testes *in vitro* e toxicidade, as doses terapêuticas foram definidos como 125 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em banhos de 2 h

durante dois dias consecutivos e um banho de 125 µg/mL durante 12 h. O banho terapêutico com o extrato mostrou 100% de eficácia em todas as concentrações testadas, em relação ao grupo controle (não tratados) e acetona 0,2%. Os parasitos foram identificados como *Anacanthorus spathulatus* Kritsky, Thatcher and Kayton, 1979.

A análise do oxigênio dissolvido $7,0 \pm 0,35 \text{ mg.L}^{-1}$, pH $6,35 \pm 0,54$, temperatura $26,86 \pm 0,47 \text{ }^\circ\text{C}$, condutividade elétrica $25,20 \pm 2,46$, amônia $0,09 \pm 0,02 \text{ mg.L}^{-1}$, nitrito $0,04 \pm 0,02 \text{ mg.L}^{-1}$, alcalinidade $3,33 \pm 0,94 \text{ mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ e dureza $3,04 \pm 1,05 \text{ mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ após a adição do extrato e da acetona 0,2%, se mantiveram dentro da normalidade para a espécie estudada (Costa et al., 2004; Marcon et al., 2004; Aride et al., 2007), não interferindo nos resultados obtidos.

3.5. Parâmetros hematológicos

Em relação aos parâmetros hematológicos, foi observada diminuição na concentração de hemoglobina, no percentual de hematócrito acompanhado de diminuição na contagem de eritrócitos ($p < 0,05$) nos peixes controle (não tratados) e banhados com acetona em comparação ao grupo basal (Tabela 2). Os peixes tratados com o extrato apresentaram tendência a normalizar os valores de acordo com o grupo basal.

Foi observada redução significativa ($p < 0,05$) no número de trombócitos nos peixes após o banho com acetona a 0,2% em relação ao grupo basal e 125 µg/mL, assim como a diminuição do número de linfócitos circulantes após banho de acetona com 0,2% e 125 µg/mL 12 h em relação aos peixes não tratados. Número de monócitos foi maior nos peixes tratados com 125 µg/mL 12 h do que nos peixes não tratados. Por outro lado, aumento significativo na contagem de leucócitos totais foi encontrado em peixes tratados com 125 µg/mL 12 h em relação a grupo basal e acetona. Leucócitos granulares PAS⁺ (LG-PAS) apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) em peixes tratados com 250 µg/mL 2 h em relação aos demais tratamentos (Tabela 3).

3.6. Parâmetros bioquímicos

A concentração de glicose foi significativamente maior nos peixes tratados com o extrato do que nos demais tratamentos. A concentração de proteína total foi significativamente menor no grupo basal em relação ao controle e nos peixes tratados com o extrato. O colesterol apresentou aumento significativo nas concentrações de 250 e 125 µg/mL (12 h) em relação ao grupo controle. O cortisol foi significativamente maior no grupo submetido à acetona em relação aos demais tratamentos (Tabela 2).

Tabela 1. Índices parasitológicos de *Anacanthorus spathulatus* de *Colossoma macropomum* após banhos com extrato acetônico das sementes de *Bixa orellana* e acetona 0,2%.

Índices parasitológicos	Acetona	Controle	125 µg.mL ⁻¹ (2 h)	250 µg.mL ⁻¹ (2 h)	125 µg.mL ⁻¹ (12 h)
Prevalência (%)	100	100	0	0	0
Intensidade média	169,5 ± 49,3	165,2 ± 68,4	0	0	0
Abundância média	169,5 ± 49,3	165,2 ± 68,4	0	0	0

Tabela 2. Análise sanguínea de *Collossoma macropomum* submetidos a banhos com extrato acetônico das sementes de *Bixa orellana* e acetona 0,2 %. Número total de eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), glicose plasmática (Gl); proteína total (PT), colesterol total (CT).

Parâmetros Sanguíneos	Extrato de <i>Bixa orellana</i>					
	Controle	125 µg/mL 2 h	250 µg/mL 2 h	500 µg/mL 2 h	125 µg/mL 12 h	
Hemoglobina (g/dL)	9,7 ± 1,0 e	6,6 ± 0,5 a	6,8 ± 1,0 ab	7,6 ± 0,8 bc	8,6 ± 0,9 d	8,0 ± 0,5 de
Hematócrito (%)	21,9 ± 1,9 a	18,8 ± 1,3 bc	17,7 ± 2,3 b	22,4 ± 1,7 a	22,1 ± 1,9 a	21,0 ± 1,9 ac
RBC (x 10 ⁶ /µL ⁻¹)	1,6 ± 0,1 c	1,2 ± 0,1 ab	1,2 ± 0,2 a	1,3 ± 0,1 a	1,4 ± 0,1 bc	1,3 ± 0,2 ab
VCM (fL)	137,0 ± 2,4 a	155,6 ± 16,1 ab	148,4 ± 19,3ab	172,5 ± 15,0 b	160,2 ± 17,2 ab	161,2 ± 19,9 ab
CHCM (g/dL)	46,1 ± 3,2 c	35,7 ± 1,9 ab	38,1 ± 1,3 ab	34,9 ± 2,9 b	39,0 ± 3,2 a	38,8 ± 2,8 a
HCM (pg)	60,9 ± 5,5 a	54,4 ± 3,8 a	55,5 ± 7,5 a	58,3 ± 8,1 a	61,8 ± 9,0 a	61,9 ± 6,7 a
GLI (mg/dL)	38,8 ± 3,2 a	41,7 ± 3,2 a	44,3 ± 5,5 a	80,5 ± 12,8 b	83,9 ± 23,9 b	90,9 ± 9,5 b
PT (g/dL)	1,7 ± 0,2 b	2,1 ± 0,1 b	2,8 ± 0,4 a	3,1 ± 0,5 a	3,0 ± 0,2 a	3,1 ± 0,4 a
COL (mg/dL)	58,2 ± 3,4 ab	59,0 ± 2,8 ab	52,6 ± 8,8 b	57,8 ± 3,0 ab	63,3 ± 10,6 a	65,4 ± 8,2 a
Cortisol (ng/mL)	89,6 ± 21,0 a	157,5 ± 29,0 b	94,4 ± 38,7 a	91,0 ± 30,1 a	98,5 ± 24,2 a	96,7 ± 13,2 a

Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05) entre os tratamentos.

Tabela 3. Número total de trombócitos circulantes, leucócitos totais, leucócitos imaturos (leu. imaturos) e contagem diferencial de leucócitos de *Colossoma macropomum* submetidos a banhos com extrato acetônico das sementes de *Bixa orellana* e acetona 0,2 %. Basal significa, antes do tratamento. LG-PAS: leucócito granular PAS⁺.

Parâmetros	Basal	Acetona 0,2%	Controle	125 µg/mL 2 h	250 µg/mL 2 h	125 µg/mL 12 h
Trombócitos (x10 ³ /µL)	37,4±19,7 ^b	9,7±9,9 ^a	22,9±16,1 ^{ab}	38,7±14,0 ^b	30,7±27,4 ^{ab}	48,9±31,5 ^b
Leucócitos totais (x10 ³ /L)	17,3±16,1 ^{ab}	14,7±7,1 ^a	26,3±18,7 ^{abc}	28,2±8,6 ^{abc}	32,7±12,6 ^{bc}	39,1±17,4 ^c
Leu. imaturos (x10 ³ /µL)	1,1±1,4 ^a	1,1±0,8 ^a	1,2±1,6 ^a	3,6±1,9 ^a	2,5±1,6 ^a	3,3±2,6 ^a
Eosinófilos (x10 ³ /µL)	0,6±1,3 ^b	6,4±6,7 ^{ab}	12,3±12,7 ^a	12,7±9,8 ^a	12,1±9,1 ^a	15,1±17,0 ^a
Neutrófilos (x10 ³ /µL)	12,5±14,4 ^a	3,8±2,7 ^a	5,0±2,7 ^a	8,0±7,6 ^a	12,0±8,0 ^a	16,2±12,4 ^a
Linfócitos (x10 ³ /µL)	2,7±1,7 ^{ab}	1,5±1,3 ^b	6,2±6,6 ^a	3,1±1,7 ^{ab}	2,7±1,7 ^{ab}	1,6±1,2 ^b
Monócitos (x10 ³ /µL)	0,2±0,4 ^{ab}	0,0±0,1 ^a	0,9±1,0 ^{ab}	0,7±1,3 ^{ab}	0,5±0,6 ^{ab}	1,3±1,2 ^b
LG-PAS ⁺ (x10 ³ /µL)	0,1±0,3 ^{ab}	0,2±0,4 ^{ab}	0,4±0,3 ^{ab}	0,2±0,2 ^{ab}	2,9±1,9 ^c	1,5±1,5 ^b

Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05) entre os tratamentos.

4. Discussão

No presente estudo, a eficácia do extrato das sementes de urucum sobre parasitos Monogenea do tabaqui foi demonstrada no teste *in vitro* corroborando os resultados de Levy et al. (2015), na avaliação de extratos etanólicos e aquosos de gengibre contra *Gyrodactylus turnbulli* em *Poecilia reticulata*, e de Fu et al. (2014) sobre a atividade antiparasitária dos extratos acetônico e acetato de etila de *Morus alba* contra *Ichthyophthirius multifiliis*.

Neste estudo, 100% de eficácia no teste *in vivo* foi semelhante ao verificado por Boijink et al. (2011) com banho com óleo essencial de *Ocimum gratissimum* que observaram 100% de eficácia sobre Monogenea de tabaqui. Resultados semelhantes foram encontrados para *Carassius auratus* infestados por *Dactylogyrus intermedius* e tratados com os extratos metanólicos e acetato de etila de *Radix bupleuri chinensis* (Wu et al., 2011), aquosos e metanólicos de *Cinnamomum cassia*, metanólicos de *Lindera aggregata* e acetato de etila de *Pseudolarix kaempferi* (Ji et al., 2012). Boijink et al. (2015) também relataram redução no número de Monogenea em tabaqui após banho com eugenol. Semelhante ao observado neste estudo, Tu et al. (2013), demonstraram que o banho com extrato clorofórmico de *Santalum album* na dose de 40 mg.L⁻¹ apresentou 100% de eficácia contra *D. intermedius* de *C. auratus*. Por outro lado, a utilização do extrato de *Chenopodium ambrosioides* na concentração de 3,9 ml.L⁻¹ por 24 h contra Monogenea de *C. macropomum* apresentou apenas 54,4% de eficácia (Monteiro, 2012) diferindo do presente estudo. Comparado com o presente trabalho, menores eficácias foram observadas com banho terapêutico de 40 mg.L⁻¹ de óleo essencial de *Mentha piperita*, por 10 min durante 3 dias com 41,63% de eficácia contra *Cichlidogyrus tilapiae*, *Cichlidogyrus thurstonae*, *Cichlidogyrus halli* e *Scutogyrus longicornis* de *Oreochromis niloticus* (Hashimoto et al., 2016) e do extrato acetônico de *Kochia scoparia* com eficácia de 77,6% e 72,34% nas concentrações de 100 e 110 mg.L⁻¹, respectivamente, contra *D. intermedius* de *C. auratus* (Lu et al., 2012).

Extratos de *Bixa orellana* apresentam várias atividades biológicas, incluindo antibacteriana, antioxidante e antiparasitária (Fleischer et al., 2003). Estudos fitoquímicos dessa planta revelaram a presença de flavonoides, alcaloides e dos terpenoides geranylgeraniol e da bixina (Fleischer et al., 2003; Braga et al., 2007). A análise de RMN confirmou a presença da bixina no extrato acetônico. Estudos relacionam os terpenoides com atividades parasiticidas, visto que,

substâncias mais lipofílicas, atravessam a membrana da superfície dos helmintos podendo causar sua ruptura, conseqüentemente, matando os parasitos (Liu et al., 2010). Braga et al. (2007), demonstraram a atividade antiparasitária *in vitro* de extratos do urucum contra *Leishmania amazonenses* e *Leishmania chagasi*. Ritter et al. (2012), relataram em estudos sobre etnoveterinária a utilização das sementes do urucum no tratamento de sarnas de cachorro. O urucum também apresentou atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* (Braga et al., 2007), e contra algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Fleischer et al., 2003). Estes resultados confirmam a alta eficácia anti-helmíntica do extrato de *B. orellana* contra parasitos Monogenea de *C. macropomum*.

A toxicidade de uma espécie vegetal está relacionada com as substâncias presentes, a concentração utilizada, o tempo de exposição e a sensibilidade dos animais (Kumar et al., 2010). No presente estudo, as concentrações mais altas (250 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) mostraram toxicidade mais elevada. Kavitha et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes, onde a toxicidade do extrato das sementes de *Moringa oleifera* aumentou de acordo com a concentração administrada em carpas *Cyprinus carpio*.

Peixes submetidos a condições estressantes incluindo, alterações ambientais, parasitismo ou submetidos a tratamentos químicos podem apresentar alterações fisiológicas. A redução do número de eritrócitos, da concentração de hemoglobina e hematócrito pode ser devido à destruição de glóbulos vermelhos, conduzindo à anemia (Wintrobe, 1978). Isso pode explicar os achados no presente estudo nos peixes parasitados e não tratados. Jerônimo et al. (2014) observaram redução significativa no número de eritrócitos de *Piaractus mesopotamicus* altamente infestados por *Anacanthorus penilabiatatus* (Monogenea: Dactylogyridae), assim como Ghiraldelli et al. (2006) também relataram diminuição no número de eritrócitos em *O. niloticus* parasitadas por *Cichlidogyrus sclerosus* (Monogenea). Ranzani-Paiva et al. (2000) verificaram diminuição no percentual de hematócrito em *Prochilodus lineatus* infectados por *Dactylogyrus*. Entretanto, no presente estudo, peixes submetidos ao banho apresentaram tendência a retornar aos valores basais, mostrando o efeito benéfico do extrato nesses parâmetros hematológicos. Por sua vez, Hashimoto et al. (2016) relataram que o banho terapêutico com 40 mg.L^{-1} de *M. piperita* não causou alterações hematológicas em *O. niloticus* parasitadas por Monogenea.

Em peixes teleósteos, o sistema imunológico pode ser ativado dependendo do grau de parasitismo, causando alteração na porcentagem de células de defesa no sangue circulante (Jerônimo et al., 2011). Trombócitos estão envolvidos na coagulação e na defesa do organismo (Martins et al., 2008). Ao contrário do que o encontrada no presente estudo, Hashimoto et al. (2016), observaram diminuição do número de trombócitos em tilápia do Nilo tratada com *L. sidoides*. Aumento do número de eosinófilos pode estar relacionado com infecções parasitárias (Ranzani-Paiva et al., 2013), como observado neste estudo em tambaqui parasitados e tratados.

Cortisol e glicose plasmática são as respostas fisiológicas mais utilizadas como indicadores de estresse em peixes. Geralmente, há um aumento nesses níveis em situações desfavoráveis para suprir a maior demanda energética (Barton and Iwama, 1991; Fagundes et al., 2008). A princípio, o aumento na glicose verificado nos peixes tratados sugere uma condição de estresse desencadeada pelo extrato. Resultados similares foram reportados em *O. niloticus* submetidas a banho com *Lippia sidoides* (Hashimoto et al. 2016), em *Oncorhynchus mykiss* submetidos a banhos com própolis (Talas and Gulhan, 2009), e em *C. carpio* submetidos a banhos com extrato de *M. oleífera* (Kavitha et al., 2012). Por outro lado, o cortisol plasmático aumentou significativamente apenas nos peixes submetidos ao banho com acetona. Estes resultados surpreenderam, visto que se esperava aumento do cortisol nos peixes tratados com extrato de urucum, corroborando o aumento da glicose plasmática.

Entretanto, o nível de glicose nos peixes pode ter sido influenciado pelos carotenoides presentes no extrato, como observado em outros animais. Bautista et al. (2004), avaliando a toxicologia subaguda em ratos machos, detectaram aumento significativo da glicemia após serem tratados com sementes de urucum (teor de bixina 27%). Resultados semelhantes foram encontrados em ratos alimentados com extrato de urucum (teor de bixina 50%), e com norbixina purificada (Fernandes et al, 2002). Segundo Subczynski e Wisniewska (2000), os carotenoides podem interagir com a membrana das células, afetando a entrada de glicose. Isso pode ter causado diminuição na absorção da glicose pela célula, e consequentemente, hiperglicemia. Portanto, estudos são necessários para compreender a dinâmica da interação desses carotenoides com as membranas celulares em peixes, e assim elucidar como a homeostase da glicose é afetada. Por sua vez, o aumento no cortisol plasmático nos peixes submetidos ao banho com acetona sugere uma situação de estresse. Contudo, peixes submetidos ao

banho com extrato, não apresentaram aumento no cortisol, o que sugere o efeito protetor do extrato contra o estresse causado pela acetona.

Este é o primeiro estudo utilizando urucum no tratamento de doenças em peixes, e sobre sua fisiologia, fato que dificulta a comparação com outros estudos. Portanto, novas pesquisas devem ser realizadas a fim de esclarecer a real causa dessas alterações.

5. Conclusões

O presente estudo foi o primeiro a relatar a utilização do extrato das sementes de urucum contra parasitos *Monogenea*. O modelo de estudo utilizado *in vitro* de observação de parasitos nas brânquias em placas de Petri teve sucesso e pode ser utilizado para testes de tratamento de parasitos de peixes. O tratamento apresentou 100% de eficácia em todas as concentrações e tempos testados. Entretanto, mais estudos devem ser conduzidos para determinar a causa das alterações sanguíneas dos peixes, e se concentrações menores de extrato ou do tempo de banho podem ter a mesma eficácia antiparasitária, sem alterar a fisiologia do animal. Além disso, o mecanismo de ação anti-helmíntica, isolamento das substâncias bioativas e avaliações de riscos ecológicos ainda não são conhecidos. O banho com o extrato de sementes de urucum pode ser utilizado no tratamento de parasitos *Monogenea* de tambaqui como método para reduzir o parasitismo antes dos animais serem transportados ou povoar o viveiro.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de doutorado da aluna J.I.A Andrade; CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de produtividade em pesquisa à M.L. Martins (CNPq 305869-14-0), J.L.P. Mouriño e C.V. Nunez. Ao projeto de Desenvolvimento da Aquicultura e de Recursos Pesqueiros na Amazônia – DARPA, FINEP (01.09.0472.00) pelo apoio financeiro.

6. Referências

Arde, P.H.R., Roubach, R., Val, A.L., 2007. Tolerance response of tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. *Aquat. Bot.* 38, 588-594.

- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.* 1, 3-26.
- Bautista, A.R.P.L., Moreira, E.L.T., Batista, M.S., Miranda, M.S., Gomes, I.C.S., 2004. Subacute toxicity assessment of annatto in rat. *Food Chem. Toxicol.* 42, 625–629.
- Boijink, C.L., Inoue, L.A.K.A., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., 2011. Boas práticas de manejo na piscicultura para conservação da qualidade ambiental: Uso de produtos naturais como anti-helmíntico em tambaqui. *Anais do Seminário produtividade agropecuária e benefícios socioambientais das pesquisas da Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos 88 Embrapa Amazônia Ocidental*, pp. 41-45.
- Boijink, C.L., Miranda, W.S.C., Chagas, E.C., Dairiki, J.K., Inoue, L.A.K.A., 2015. Anthelmintic activity of eugenol in tambaquis with monogenean gill infection. *Aquaculture* 438, 138-140.
- Boyd, C.E., Tucker, C.S., 1992. Water quality and pond soil. *Analyses for aquaculture*. Auburn University. Auburn. Alabama, 183 pp.
- Braga, F.G., Bouzada, M.L. M., Fabri, R.L., Matos, M.O., Moreira, F.O., Scio, E., Coimbra, E.S., 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 111, 396-402.
- Bulfon, C., Volpatti, D., Galeotti, M., 2015. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquac. Res.* 46, 513–551.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83, 575–583.
- Carneiro, D.O., Figueiredo, H.C.P., Pereira Júnior, D.J., Leal, C.A.G., Logato, P.V.R., 2007. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 4, 869-876.
- Claudiano, G.S., Dias Neto, J., Sakabe, R., Cruz, C., Salvador, R., Pilarski, F., 2009. Efficacy of aqueous extract of “Terminalia catappa” in tambaqui juveniles parasitized by monogenean and protozoan. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 10 (3), 625–636.
- Costa, O.T.F.; Ferreira, D.J.S.; Mendonça, F.P.; Fernandes, M.N., 2004. Susceptibility of Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae) to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture* 232, 627-636.

- Dotta, G., Brum, A., Jeronimo, G.T., Marschin, M., Martins, M.L., 2015. Effect of dietary supplementation with propolis and *Aloe barbadensis* extracts on hematological parameters and parasitism in Nile tilapia. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 24, 66-71.
- Eiras, J.C., Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C., 2010. Diversidade dos parasitas de peixes de água doce do Brasil. Maringá, Clichetec, 333 pp.
- Fagundes, M.; Urbinati, E. C., 2008. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. *Aquaculture* 276, 112-119.
- Fernandes, A.C.S., Almeida, C.A., Albano, F., Laranja, G.A.T., Felzenszwalb, I., Lage, C.L.S., Sa, C.C.N.F., Moura, A.S., Kovary, K., 2002. Norbixin ingestion did not induce any detectable DNA breakage in liver and kidney but caused a considerable impairment in plasma glucose levels of rats and mice. *J. Nutr. Biochem.* 13, 411-420.
- Fleischer, T.C., Ameadea, E.P.K., Mensaha, M.L.K., Sawyer, I.K., 2003. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia* 74, 136-138.
- Forwood, J.M., Harris, J.O., Deveney, M.R., 2013. Efficacy of current and alternative bath treatments for *Lepidotrema bidyana* infecting silver perch, *Bidyanus bidyanus*. *Aquaculture* 416-417, 65-71.
- Fu, Y.W., Zhang, Q.Z., Xu, D.H., Xia, H., Cai, X.X., Wang, B., Liang, J.H., 2014. Parasiticidal effects of *Morus alba* root bark extracts against *Ichthyophthirius multifiliis* infecting grass carp. *Dis. Aquat. Org.* 108, 129-136.
- Gomes, A.L., Bernardino, G., Costa, A.B., Corrêa, M.A., Feitosa, C.P., 2012. Investigação sanitária de peixes cultivados no Estado do Amazonas. *Anais do V Aquaciência*, Palmas, Tocantins, pp. 1-5.
- Ghiraldelli, L., Martins, M.L., Yamashita, M.M., Jerônimo, G.T., 2006. Ectoparasites influence on the haematological parameter of Nile tilapia and carp cultured in the state of Santa Catarina, south Brazil. *J. Fish. Aquat. Sci.* 3, 270-276.
- Hashimoto, G.S.O., Neto, F.M., Ruiz, M.L., Acchile, M., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Martins, M.L., 2016. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture* 450, 182-186.
- Jerônimo, G.T., Laffitte, L.V., Speck, G.M., Martins, M.L., 2011. Seasonal influence on the hematological parameters in cultured Nile tilapia from southern Brazil. *Braz. J. Biol.* 71, 719-725.

- Jerônimo, G.T., Pádua, S.B., Bampi, D., Gonçalves, E., Garcia, P., Ishikawa, M. M.; Martins, M.L. 2014. Haematological and histopathological analysis in South American fish *Piaractus mesopotamicus* parasitized by monogenean (Dactylogyridae). *Braz. J. Biol.* 74(4), 1000-1006.
- Ji, J., Lu, C., Kang, Y., Wang, G.X., Chen, P., 2012. Screening of 42 medicinal plants for in vivo anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol. Res.* 111, 97-104.
- Kavitha, C., Ramesh, M., Kumaran, S.S., Lakshmi, S.A., 2012. Toxicity of *Moringa oleifera* seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64, 681-687.
- Kritsky, D.C., Thatcher, V.E., Kayton, R.J., 1979. The Anacanthorinae Price, 1967, with the proposal of four new species of Anacanthorus Mizelle & Price, 1965, from Amazonian fishes. *Acta Amaz.* 9, 355-361.
- Kubtiza, F., 2015. Aquicultura no Brasil: Principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafios. *Panorama da Aquicultura*, 25, 10-23.
- Kumar, A., Prasad, M.R., Mishra, D., Srivastav., SK, Srivastav, A.K., 2010. Toxicity of aqueous extract of *Euphorbia tirucalli* latex on catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 73, 671-3.
- Levy, G., Zilberg, D., Paladinia, G., Fridman, S., 2015. Efficacy of ginger-based treatments against infection with *Gyrodactylus turnbulli* in the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). *Vet. Parasitol.* 209, 235-241.
- Liu, C., Zhou, H.B., Zhang, W.D., 2010. Terpenoids from Stems and Leaves of *Cupressus gigantean*. *Chinese J. Nat. Med.* 8, 405-410.
- Lôbo, K.M.S., Athayde, A.C.R., Silva, A.M.A., Rodrigues, F.F.G., Lobo, I.S., Bezerra, D.A.C., Costa, J.G.M., 2010. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam, e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F.Autin & Staples, do semiárido paraibano. *Rev. Bras. Plan. Med. Botucatu* 2, 227-233.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 512 pp.
- Lu, C., Zhang, H.-Y., Ji, J., Wang, G.-X., 2012. In vivo anthelmintic activity of *Dryopteris crassirhizoma*, *Kochia scoparia*, and

- Polygala tenuifolia* against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). Parasitol. Res. 110, 1085-1090.
- Marcon, J.L., Moreira, S.S., Fim, J.D.I., 2004. Median lethal concentration (LC₅₀) for un-onized ammonia in two Amazonian fish species, *Colossoma macropomum* and *Astronotus ocellatus*. In: VI International Congress on the Biology of Fish. Manaus. 1, 105-116.
- Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., Amaral, G.V., Vieira, F.N., Dotta, G., Jatobá, A.M.B., Pedrotti, F.S., Jerônimo, G.T., Buglione-Neto, C.C., Pereira, J.G., 2008. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus sp.* Braz. J. Biol. 68, 631-637.
- Matyar, F., Akkan, T., Uçak, T., Uçak, Y., Eraslan, B., 2010. *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea), Environ. Monit. Assess. 167, 309-320.
- Monteiro, P.C., 2012. O uso do extrato aquoso de mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) no controle de monogenóideos (Plathyhelminthes) em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Dissertação de Mestrado. Universidade Nilton Lins. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 90 pp.
- Natt, M.P., Herrick, C.A., 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leucocytes of the chicken. Poultry Sci. 31, 735-738.
- Pavanelli, G.C., Eiras, J.C., Takemoto, R.M. (Ed 3ª), 2008. Doenças de Peixes. Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento. Universidade Estadual de Maringá, 305 pp.
- Preston, H.D., Rickard, M.D., 1980. Extraction and chemistry of annatto. Food Chem. 5, 47-56.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Silva-Souza, A.T., Pavanelli, G.C., Takemoto, R.M., 2000. Hematological characteristics and relative condition factor (Kn) associated with parasitism in *Schizodon borelli* (Osteichthyes, Anostomidae) and *Prochilodus lineatus* (Osteichthyes, Prochilodontidae) from Paraná River, Porto Rico region, Paraná, Brazil. Acta Sci. 22, 515-521.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I. (Ed. 1ª), 2013. Métodos para análise hematologia de peixes. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 142 pp.
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P., 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to

- chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture* 433, 50-61.
- Ritter, R.A., Monteiro, M.V.B., Monteiro, F.O.B., Rodrigues, S.T., Soares, M.L., Silva, J.C.R., Palha, M.D.C., Biondi, G.F., Rahal, S.C., Tourinho, M.M., 2012. Ethnoveterinary knowledge and practices at Colares island, Pará state, eastern Amazon, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 144, 346-352.
- Roubach, R., Correia, E.S., Zaiden, S., Martino, R.C., Cavalli, R.O., 2003. Aquaculture in Brazil. *J. World Aquacult. Soc.* 34, 28-35.
- Subczynski, W.K., Wisniewska, A., 2000. Physical properties of lipid bilayer membranes: relevance to membrane biological functions. *Acta Biochim. Pol.* 47, 613-625.
- Suhet, M.I., Chocken-Iturrino, R.P., Amaral, L.A., 2011. Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por espécies de *Aeromonas* isoladas de criação intensiva de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Ars Veterinaria* 1, 36-44.
- Talas, Z.S., Gulhan, M.F., 2009. Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1994-1998.
- Tavechio, W.L.G., Guidelli, G., Port, L., 2009. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em Piscicultura. *Bol. Inst. Pesca* 2, 335-341.
- Tocchini, L., Mercadante, A.Z., 2001. Extraction and determination of bixin and norbixin in annatto spice ("colorífico"). *Food Sci. Technol.* 21, 310-313.
- Tu, X., Ling, F., Huang, A., Zhang, Q., Wang, G., 2013. Anthelmintic efficacy of *Santalum album* (Santalaceae) against monogenean infections in goldfish. *Parasitol. Res.* 112, 2839-2845.
- Varella, A.M.B., Peiro, S.N., Malta, J.C.O., 2003. Monitoramento da parasitofauna de *Colossoma macropomum*, cultivado em tanques-rede em um lago de várzea na Amazônia, Brasil. *Proc. XII Braz. Symp. Aquac., Goiânia*, 2, 95-106.
- Verdouw, H., Van Eched, C.J.A., Dekkers, E.M.J., 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium siliclylate. *Water Res.* 6, 397-402.
- Wang, Y., Wu, Z.F., Wang, G.X., Wang, F., Liu, Y.T., Li, F.Y., Han, J., 2010. In vivo anthelmintic activity of bruceine A and bruceine D from *Brucea javanica* against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Vet. Parasitol.* 177, 127-133.

- Wintrobe, M.M., 1934. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematol.* 51, 32-49.
- Wu, Z.F., Zhu, B., Wang, Y., Lu, C., Wang, G.X., 2010. In vivo evaluation of anthelmintic potential of medicinal plant extracts against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol. Res.* 108, 1557-1563.

CAPÍTULO 2

Parâmetros sanguíneos de *Colossoma macropomum* tratados com extrato das sementes de *Bixa orellana* após infecção por *Aeromonas hydrophila* e *Monogenea*

Blood parameters of *Colossoma macropomum* treated with seed extract of *Bixa orellana* after infection by *Aeromonas hydrophila* and *Monogenea*

**Jaqueline I.A. Andrade^a, Cecilia V. Nunez^b, Raphael B. Santos^c,
Jandira K.O. Araújo^d, Gabriela T. Jerônimo^{ad}, José L.P Mouriño^a,
Maurício L. Martins^a**

^aLaboratório AQUOS – Sanidade de Organismos Aquáticos,
Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias (CCA),
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga
1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil

^bLaboratório LABB – Laboratorio de Bioprospeção e Biotecnologia,
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Av. André
Araújo, 2.936, Petrópolis, 69067-375, Manaus, AM, Brasil

^cLAFAP – Laboratorio de Fisiologia Aplicada a Piscicultura, INPA

^dPrograma de Pós Graduação em Aquicultura, Universidade Nilton
Lins/INPA, Av. Prof. Nilton Lins, 3259, 69058-030, Manaus, AM,
Brasil

Artigo nas normas da *Aquaculture*

Highlights

- Extratos vegetais tratamento reduzem o impacto ambiental na aquicultura.
- Extrato acetônico das sementes de urucum apresentou atividade antimicrobiana contra *Aeromonas hydrophila* e reduziu a infestação pelo monogenóides *Anacanthorus spathulatus*.
- A concentração inibitória mínima (CIM) mais elevada foi obtida com a extração de acetona.
- Aumento no número de eritrócitos e concentração de hemoglobina sugere uma resposta adaptativa sob infecção por patógenos.

Resumo

Este estudo avaliou a utilização *in vitro* e *in vivo* de banho terapêutico com extrato de sementes de urucum *Bixa orellana* sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de *Colossoma macropomum* naturalmente parasitados por *Anacanthorus spathulatus* e experimentalmente infectados com *Aeromonas hydrophila*. O extrato foi analisado por ressonância magnética nuclear (RMN) e apresentou atividade antibacteriana e anti-helmíntica *in vitro* contra os patógenos. Os peixes suportaram às concentrações avaliadas no teste de toxicidade. Com base nestes resultados, foi realizado o teste *in vivo* com 180 peixes distribuídos seis tratamentos em triplicata: peixes não parasitados e não injetados com *A. hydrophila* (basal); peixes não parasitados e não injetados com bactéria expostos a acetona 0,2%; peixes parasitados injetados com bactéria não tratados com o extrato; peixes parasitados infectados com bactéria tratados com 125 µg/mL em banhos de 2 h por dois dias consecutivos; peixes parasitados injetados com bactéria tratados com 250 µg/mL de extrato em banhos de 2 h por dois dias consecutivos; peixes parasitados injetados com bactéria tratados com 125 µg/mL de extrato em banho de 12 h. Após o último banho, os peixes foram coletados para análise parasitológica e sanguínea. O extrato acetônico apresentou concentração inibitória mínima de 125 µg.mL⁻¹ contra *A. hydrophila* no teste *in vitro*, e 100% de eficácia no teste *in vivo* em todas as concentrações e tempos avaliados. A infecção com *A. hydrophila* não causou mortalidade nos tambaquis. Entretanto, o exame macroscópico interno revelou sinais clínicos como ascite e hemorragias no fígado, rim e baço. Observou-se aumento na concentração de hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular média e no número total de eritrócitos acompanhado de diminuição no percentual de hematócrito nos peixes não tratados em comparação ao grupo basal. A glicose foi significativamente maior nos peixes tratados com o extrato quando comparado com os grupos basal e controle. Os resultados demonstraram que o banho com extrato de urucum é um tratamento alternativo eficaz para tratar doenças de peixes. Embora o extrato tenha apresentado ação antimicrobiana *in vitro*, não foi possível avaliar sua eficácia *in vivo* em termos de mortalidade, mas a análise macroscópica mostrou que a infecção teve sucesso.

Palavras-chave: Piscicultura, fitoterápico, fisiologia, urucum

Abstract

This study evaluated the use *in vitro* and *in vivo* of therapeutic baths with seed extracts of annatto *Bixa orellana* on the hematological and biochemical parameters of *Colossoma macropomum* naturally parasitized by *Anacanthorus spathulatus* and experimentally infected by *Aeromonas hydrophila*. The extract was analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) and presented antimicrobial and antiparasitic activity *in vitro* against pathogens. The fish supported the toxicity test and based on these results an *in vivo* assay was performed with 180 fish distributed in six treatments in triplicate: parasitized fish non-injected with *A. hydrophila* (basal); non-parasitized fish non-injected exposed to acetone 0.2 %; parasitized fish injected non-treated with the extract; parasitized fish injected treated with 125 µg/mL of extract in 2 h bath for two consecutive days; parasitized fish injected treated with 250 µg/mL of extract in 2 h bath for two consecutive days; parasitized fish injected treated with 125 µg/mL of extract for 12 h. After last bath, the fish were collected for parasitological and hematological analysis. Acetonic extract showed minimal inhibitory concentration of 125 µg.mL⁻¹ against *A. hydrophila* in the *in vitro* test and 100% efficacy in the *in vivo* test for all concentrations and times. Infection with *A. hydrophila* did not cause mortality. Nevertheless, the gross pathology showed clinical signs like ascites and hemorrhagic liver, kidney and spleen. It was observed an increase in the hemoglobin concentration, mean corpuscular hemoglobin concentration and total number of erythrocytes followed by a decrease in hematocrit percentage in non-treated fish compared to basal group. Glucose was significantly higher in treated fish than that found in those of basal and control. The results demonstrated that annatto bath consists in an efficacious alternative to treat fish diseases. Although the extract has presented antimicrobial activity *in vitro*, was not possible to verify its efficacy *in vivo* in terms of mortality, but in gross pathology the infection was successful.

Key-words: Fish farming, physiology, phytotherapeutic, annatto

1.Introdução

Helmintos Monogenea são comuns em peixes cultivados em sistemas de criação intensiva (Ghiraldelli et al., 2006), onde predominam altas densidades de estocagem, baixa renovação de água e acúmulo de matéria orgânica, fatores que contribuem para a reprodução e desenvolvimento desses patógenos (Moraes e Martins, 2004). Apresentam ciclo de vida direto e, se reproduzem rapidamente em condições adequadas. Normalmente, não são os agentes primários causadores de mortalidade em peixes, exceto no caso de altas infestações (Martins et al., 2010; Jerônimo et al., 2014.). Entretanto, apresentam uma estrutura esclerotizada, chamada de haptor, que serve para fixação no hospedeiro. Essa estrutura aumenta a patogenicidade, causando lesão tecidual principalmente do epitélio branquial, com conseqüente aumento da produção de muco, hemorragia da pele, anorexia e morte de peixes (Pavanelli et al., 2008). Além disso, as lesões produzidas servem de portas de entrada para infecções bacterianas sistêmicas (Busch et al., 2003; Xu et al., 2009).

Dentre as bacterioses frequentes na piscicultura, *Aeromonas hydrophila* pode gerar quadros graves de septicemia e causar grandes perdas em sistemas de criação intensiva (Silva et al., 2012) e seu controle tornou-se um desafio na piscicultura. No entanto, o uso frequente e inadequado de quimioterápicos como a formalina, permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio, praziquantel, mebendazol e os antibióticos para infecções bacterianas (Pavanelli et al., 2008; Forwood et al., 2013) tem resultado em efeitos negativos como resistência à droga, imunossupressão, contaminação ambiental e riscos à saúde humana (Belém-Costa e Cyrino, 2006; Matyar et al., 2010; Lôbo et al., 2010; Suhel et al., 2011). Esse fato tem estimulado a pesquisa por novos medicamentos, sendo que os de origem vegetal têm apresentado resultados interessantes na prevenção e no tratamento de patógenos de peixes, incluindo as parasitoses e as bacterioses (Harikrishnan et al., 2010; Reverter et al., 2014; Hashimoto et al., 2016).

Dentre as espécies vegetais estudadas com finalidade terapêutica está o urucum, *Bixa orellana*, originário de florestas tropicais das Américas Central e do Sul (Lorenzi e Matos, 2002), apresenta ampla utilização na indústria alimentícia, por sua capacidade de conservar a qualidade dos alimentos (Braga et al., 2007) e na indústria farmacêutica. As sementes possuem flavonoides, alcaloides (Fleischer et al., 2003), e são ricas em carotenoides, sendo o mais abundante a bixina, compreendendo cerca de 80% do total de carotenoides nas sementes

(Preston e Rickard, 1980). Extratos das sementes de urucum apresentam atividades biológicas, como antibacteriana, antiparasitária e antioxidante. Porém, sua utilização está relacionada à agentes etiológicos de interesse clínico, e até o momento, não há nenhum relato sobre a sua utilização no controle de patógenos de peixes.

Este estudo avaliou a utilização *in vitro* e *in vivo* de banho terapêutico do extrato acetônico das sementes de urucum sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de *Colossoma macropomum* naturalmente parasitados por *Monogenea* e experimentalmente infectados com *A. hydrophila*.

2. Material e Métodos

2.1 Obtenção dos peixes e dos parasitos

Juvenis de tambaqui foram obtidos de uma piscicultura comercial de Manaus, AM, Brasil e na chegada, dez peixes foram anestesiados com óleo de cravo (20 mg.L⁻¹), e eutanasiados para confirmação da presença dos parasitos *Monogenea* usando microscópio de dissecação (Zeiss Stemi 2000-C, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Os peixes foram mantidos por 15 dias em tanques de 500 L em sistema estático, com aeração constante e alta densidade, a fim de promover maior nível de infestação. Foram alimentados duas vezes ao dia (9:00 h e 16:00 h) até a saciedade aparente utilizando ração comercial contendo 36% de proteína bruta (NUTRIPISCIS). Durante os ensaios foram medidos o oxigênio dissolvido com o auxílio de oxímetro digital YSI (modelo 55, Ohio, USA), potencial hidrogeniônico pH, temperatura e condutividade elétrica com medidor multiparâmetro YSI (modelo 63, Ohio, USA), amônia e nitrito por método colorimétrico segundo Verdouw (1978) e Boyd e Tucker (1992), respectivamente, alcalinidade e dureza segundo Boyd e Tucker (1992).

2.2. Ensaio “*in vitro*” do extrato das sementes de urucum

2.2.1. Preparo do extrato

As sementes de urucum, *B. orellana* foram cedidas pela empresa Chr. Hansen Indústria e Comércio Ltda, Valinhos, São Paulo das quais foram preparados três diferentes extratos, utilizando-se acetona 100%, [(água/etanol 1:1)/acetona 1:1] e Etanol 70 %, na proporção de 25 g de sementes por 100 mL de solvente. Para a extração utilizou-se banho de ultrassom (Unique, modelo USC 3300) por 20 min., e em seguida o solvente foi retirado com auxílio de rota- evaporador (Fisatom, modelo

801) e armazenado em frasco âmbar em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização. Os extratos foram denominados de: acetônico, hidroalcoólico/acetônico e hidroalcoólico 70%, respectivamente.

2.2.2. Composição química do extrato e quantificação de bixina

Os extratos foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 300 MHz (Bruker – modelo Fourier 300) e as amostras foram padronizadas, pesados 10 mg de cada extrato, diluídos em 600 μL de DMSO- d_6 . Cada espectro foi analisado e comparado com as análises em RMN das substâncias já isoladas da espécie, visando detectar sua presença em cada amostra.

Os extratos das sementes de urucum (10 mg) obtidos por extração com acetona 100%, [(água/etanol 1:1)/acetona 1:1] e etanol 70 % foram dissolvidos em clorofórmio e as soluções resultantes tiveram seus volumes acertados para 100 mL com o mesmo solvente. Uma alíquota de 10 mL de cada solução foi retirada e diluída até 50 mL com CHCl_3 , obtendo-se três soluções com concentração de 20 mg/L, e em seguida analisadas em espectrofotômetro UV-Vis. Foi determinada a concentração de bixina utilizando a expressão $A = acb$, onde A representa a absorvância da solução clorofórmica do extrato, lida no espectrofotômetro, c é a concentração de bixina na solução (g/L), b é o caminho ótico (1 cm) e a é o coeficiente de absorção da bixina em CHCl_3 (2826) no λ_{max} 470 nm descrito por Mercadante e Tocchini (2001). O rendimento de bixina foi determinado considerando-se a massa do extrato utilizada em cada diluição. A relação bixina/geranilgeraniol foi determinada como mostrado na equação, a relação de bixina/geranilgeraniol = $\Sigma H\beta/H-1$.

2.2.3. Teste de atividade antibacteriana

O teste de atividade antibacteriana foi realizado com os três tipos de extratos: acetônico, hidroalcoólico/acetônico e hidroalcoólico 70%, a fim de determinar o mais ativo, para posteriormente ser utilizado no teste *in vivo*.

A cepa de *A. hydrophyla* (Código 125 FG) foi isolada de tilápia doente no Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo e preservada em glicerol 20% em freezer -80°C no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do INPA. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) foi realizada em caldo Mueller-Hinton (HIMEDIA) pela técnica de microdiluição em microplaca de 96 poços (Eloff, 1998). Primeiramente, os extratos foram solubilizados em meio de cultura acrescido de DMSO

a 5%, e em seguida, foram feitas diluições sucessivas nas concentrações (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,65; 7,81 e 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), em triplicata. Após adição de 95 μL de cada extrato em cada cavidade, foi adicionado 5 μL do inóculo bacteriano, McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$). Em seguida, a microplaca foi incubada a 30°C por 24 h. E após esse período, revelada com 2,3,5 cloreto de trifeniltetrazóleo. Onde houve crescimento bacteriano, os poços foram revelados em vermelho, e onde não houve crescimento, os poços permaneceram incolores. A MIC foi considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento bacteriano. Como controle negativo foi utilizado (Caldo Mueller-Hinton + DMSO 5 % + inóculo bacteriano) para certificar que atividade antibacteriana era do extrato e não do solvente; e como controle positivo o antibiótico oxitetraciclina.

A microplaca utilizada para determinação da MIC foi utilizada para determinação da Concentração Bactericida Mínima (MBC). Uma alíquota (100 μL) de cada concentração a partir do valor da MIC foi inoculada em placas de Ágar Müeller-Hinton e posteriormente incubadas a 30°C por 24 h. A MBC foi considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9% de morte microbiana).

2.3. Infecção experimental

A bactéria *A. hydrophila* foi cultivada em Ágar Mueller-Hinton 24 h antes da infecção experimental. O inóculo foi preparado com solução salina 0,85 % na concentração de 3×10^7 UFC. mL^{-1} , utilizando a escala de McFarland. Os peixes foram infectados intraperitonealmente com 100 μL de *A. hydrophila* na concentração de 3×10^7 UFC. mL^{-1} . Os sinais clínicos foram observados e a mortalidade acompanhada durante dez dias.

2.4. Banho com extrato de urucum

2.4.1. Ensaio “in vivo”

Um total de 180 juvenis de tambaqui ($30,07 \pm 1,85$ g) a partir da mesma desova foram adquiridos de piscicultor local e mantidos por 30 dias em tanques circulares de 500 L antes do início do ensaio. O desenho experimental constituiu-se de seis tratamentos, em triplicata:

- peixes saudáveis não parasitados e não infectados (basal);
- peixes saudáveis não parasitados e não infectados expostos a acetona 0,2 %;

- peixes infectados com *A. hydrophila* e parasitados com *Monogenea* não tratados com o extrato;
- peixes infectados com *A. hydrophila* e parasitados com *Monogenea* tratados com 125 µg/mL em banhos de 2 h por dois dias consecutivos;
- peixes infectados com *A. hydrophila* e parasitados com *Monogenea* tratados com 250 µg/mL de extrato em banhos de 2 h por dois dias consecutivos;
- peixes infectados com *A. hydrophila* e parasitados com *Monogenea* tratados com 125 µg/mL de em banho de 12 h.

Após o último banho, cinco peixes de cada repetição foram coletados para análise parasitológica e sanguínea.

2.5. Análises sanguíneas e parasitológicas

Os peixes foram anestesiados em solução de óleo de cravo (20 mg.L⁻¹), eutanasiados e as brânquias de cinco peixes de cada repetição foram coletadas para análise parasitológica imediata, e as dos outros cinco peixes coletadas e banhadas em água a 60°C e fixadas em álcool 70% para posterior identificação e quantificação de parasitos segundo Jerônimo et al. (2011).

A eficácia foi calculada de acordo com a fórmula: $EF = \frac{MNPC - MNPT}{MNPC} \times 100$ (EF: eficácia, MNPC: média do número de parasitos no grupo controle, MNPT: média do número de parasitos no grupo tratado) (Dotta et al, 2015). A taxa de prevalência, intensidade média e abundância média de parasitos foram calculados de acordo com Bush et al. (1997).

O sangue foi retirado a partir da veia caudal com seringas contendo EDTA a 10% e utilizado para determinação do percentual de hematócrito pelo método de micro-hematócrito e contagem total de eritrócitos (RBC) em câmara de Neubauer após diluição 1:200 em solução e Natt (1952) Herrick. A concentração de hemoglobina foi determinada por espectrofotometria utilizando kit comercial (Labtest). Os índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados de acordo com Ranzani-Paiva et al. (2013). O plasma sanguíneo obtido por centrifugação do sangue foi destinado à determinação da glicose plasmática, proteínas totais e colesterol por método colorimétrico em espectrofotômetro utilizando um kit comercial (In Vitro). O cortisol plasmático foi determinado pelo método de Elisa, com kit comercial (Human).

2.6. Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) usando o programa STATISTICA 8.0. As médias entre os tratamentos foram comparados pelo teste Tukey a 5% de significância.

3. Resultados

3.1. Teste de atividade antimicrobiana in vitro e composição do extrato

Todos os extratos foram ativos contra *A. hydrophila*, porém, o extrato acetônico apresentou maior atividade com MIC= 125 µg/mL, que os extratos hidroalcoólico/acetônico e hidroalcoólico 70%, ambos com MIC = 250 µg/mL (Tabela 1). O antibiótico oxitetraciclina apresentou MIC = 62,5 µg/mL. As análises de RMN e espectrofotométricas de UV-Vis confirmaram a presença de bixina (Figura 1), em todas as extrações. Porém, o maior rendimento foi obtido na extração com acetona 100% (Tabela 2).

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Mínima Bactericida (MBC) dos extratos das sementes de *Bixa orellana* contra *Aeromonas hydrophila*. *controle positivo

Extratos	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
Hidroalcoólico 70%	250	>1000
Hidroalcoólico/acetônico	250	>1000
Acetônico	125	>1000
Oxitetraciclina*	62,5	-

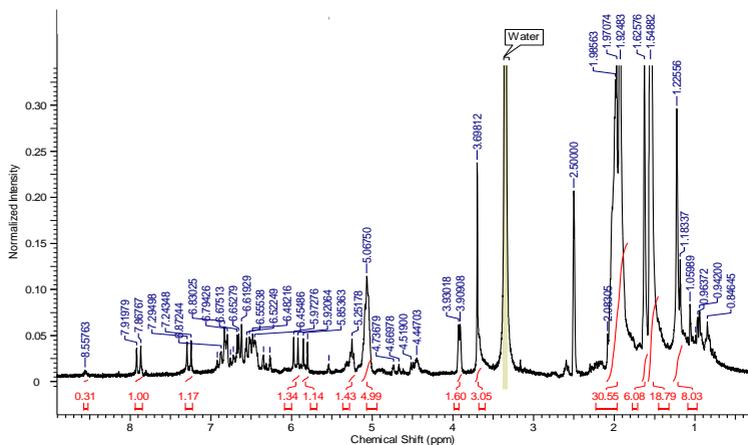


Figura 1: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H do extrato acetônico de sementes de *Bixa orellana* (urucum) (em DMSO- d_6 , 300 MHz).

Tabela 2: Rendimentos obtidos pela extração das sementes de urucum, *Bixa orellana* por diferentes solventes. ^aDeterminado por UV-Vis em relação à diluição do extrato; ^bdeterminada por RMN ¹H.

Método de extração	Massa semente (g)	Massa extrato (g)	Rendimento extração (%)	Rendimento bixina (%) ^a	Relação bixina/geraniol ^b
Hidroalcoólico 70 %	25	1,05	4,2	0,31	1:1,6
Hidroalcoólico/acetônico	25	1,03	4,1	0,68	1:1,0
Acetona 100%	25	1,7	6,8	0,98	1:0,7

3.2. Ensaio “*in vivo*”

A partir dos resultados dos testes *in vitro* de atividade antimicrobiana (Tabela 1), antiparasitária (Capítulo 1) e de toxicidade do extrato nos peixes (Capítulo 1), as doses terapêuticas foram definidas como 125 e 250 µg/mL em banhos de 2 h durante dois dias consecutivos e um banho de 125 µg/mL durante 12 h. Os parasitos foram identificados como *Anacanthorus spathulatus* Kritsky, Thatcher and Kayton, 1979.

O banho terapêutico com o extrato mostrou 100% de eficácia contra *Monogenea* em todas as concentrações e tempos testados, em relação ao grupo controle (não tratados) (Figura 2). A infecção com *A. hydrophila* não causou mortalidade nos tambaquis, mas o exame macroscópico interno revelou alguns sinais clínicos como ascite com líquido transparente, órgãos internos como fígado, rim e baço com aspecto hemorrágico. Porém, nos peixes tratados com o extrato, não foram observados sinais clínicos internos.

A análise do oxigênio dissolvido $7,0 \pm 0,35 \text{ mg.L}^{-1}$, pH $6,35 \pm 0,54$, temperatura $26,86 \pm 0,47 \text{ }^\circ\text{C}$, condutividade elétrica $25,20 \pm 2,46$, amônia $0,09 \pm 0,02 \text{ mg.L}^{-1}$, nitrito $0,04 \pm 0,02 \text{ mg.L}^{-1}$, alcalinidade $3,33 \pm 0,94 \text{ mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ e dureza $3,04 \pm 1,05 \text{ mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ após a adição do extrato e da acetona 0,2%, se mantiveram dentro da normalidade para a espécie estudada (Costa et al., 2004; Marcon et al., 2004; Aride et al., 2007), não interferindo nos resultados obtidos.

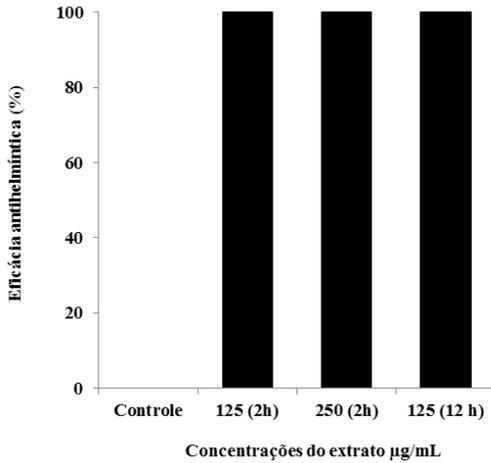


Figura 2: Eficácia anti-helmíntica *in vivo* do extrato acetônico das sementes de *Bixa orellana* contra *Anacanthorus spathulatus* de *Colossoma macropomum*.

3.3. Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Observou-se aumento na concentração de hemoglobina, CHCM e no número total de eritrócitos acompanhado de diminuição no percentual de hematócrito ($p < 0,05$) nos peixes não tratados em comparação ao grupo basal (Tabela 3). Por outro lado, não houve diferença entre os peixes não tratados e os dos grupos tratados com o extrato nestes parâmetros. Não houve diferença significativa entre o grupo basal e os peixes submetidos ao banho com acetona.

A concentração de glicose foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos peixes tratados com o extrato quando comparado com os grupos basal e controle. Não houve diferença significativa nos valores de proteína total. Resultado semelhante foi encontrado para o colesterol, com exceção do grupo controle que apresentou diminuição em relação aos expostos à acetona.

Tabela 3. Índices parasitológicos de *Colossoma macropomum* infectados com *Aeromonas hydrophila* e *Monogenea* após banhos com extrato acetônico das sementes de *Bixa orellana*.

Índices	Controle	125 µg.mL ⁻¹ (2 h)	250 µg.mL ⁻¹ (2 h)	125 µg.mL ⁻¹ (12 h)
Prevalência (%)	100	0	0	0
Intensidade média	166,7 ± 42,6	0	0	0
Abundância média	166,7 ± 42,6	0	0	0

Tabela 4. Análise sanguínea de *Colossoma macropomum* coinfectados por *Aeromonas hydrophila* e *Monogenea* submetidos a banhos com extrato acetônico das sementes de *Bixa orellana* e acetona 0,2 %. Número total de eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), glicose plasmática (GLI); proteína total (PT), colesterol total (CT).

Parâmetros	Tratamentos					
	Basal	Acetona 0,2%	Controle	125 µg.mL ⁻¹ 2 h 250 µg.mL ⁻¹ 2 h 125 µg.mL ⁻¹ 12 h		
Hemoglobina (g.dL ⁻¹)	9,7 ± 1,0 a	9,8 ± 0,7 a	14,59 ± 1,34 b	14,26 ± 1,81b	13,98 ± 1,97 b	
Hematócrito (%)	21,9 ± 1,9 a	20,7 ± 1,3 ab	18,58 ± 2,58 b	20,14 ± 3,50 ab	19,68 ± 3,61 ab	20,43 ± 2,76 ab
RBC (x 10 ⁶ .µL ⁻¹)	1,6 ± 0,1 b	1,4 ± 0,1 b	2,21 ± 0,51c	2,61 ± 0,44 ac	2,84 ± 0,58 a	2,95 ± 0,41 a
VCM (fL)	137,0 ± 2,4 a	145,6 ± 4,1 a	75,78 ± 8,88 b	73,16 ± 15,50 b	75,34 ± 19,21 b	69,29 ± 10,07 b
CHCM (g.dL ⁻¹)	46,1 ± 3,2 a	46,6 ± 5,3 a	78,42 ± 5,73 b	75,37 ± 6,59 b	74,17 ± 7,39 b	70,27 ± 9,05 b
HCM (pg)	60,9 ± 5,5	69,7 ± 9,0	61,19 ± 8,62	54,93 ± 10,40	51,28 ± 7,73	50,22 ± 4,66
GLI (mg.dL ⁻¹)	38,8 ± 3,2 a	47,9 ± 4,8 ab	38,36 ± 5,16 a	53,22 ± 7,92 b	50,91 ± 6,22 b	50,12 ± 7,20 b
PT (g.dL ⁻¹)	1,7 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,06 ± 0,52	2,18 ± 0,37	2,16 ± 0,33	2,21 ± 0,42
COL (mg.dL ⁻¹)	58,2 ± 3,4 abc	67,3 ± 8,9 b	47,78 ± 8,19 c	52,54 ± 4,65 ac	59,13 ± 5,36 ab	60,91 ± 7,81ab

Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05) entre os tratamentos.

4. Discussão

No presente estudo, foi demonstrada a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos das sementes de urucum contra *A. hydrophila*. Segundo Holetz et al. (2002), a atividade antimicrobiana de extratos vegetais com MIC menores que $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ são considerados fortes, entre 100 e $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ moderados, entre 500 e $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ fracos e maiores que $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ inativos. Portanto, de acordo com essa classificação, os extratos testados demonstraram inibição moderada contra *A. hydrophila*. Os resultados da MIC apresentaram maiores valores quando comparados com a oxitetraciclina, podendo ser explicado pelo fato de que os extratos são misturas complexas de várias substâncias, e a porção ativa pode ser muitas vezes pequena.

Estudos semelhantes mostraram que as bactérias *Flavobacterium columnare* e *A. hydrophila* foram controladas pelos extratos metanólicos de *Cariniana legalis*, *Croton floribundus* e *Myrcia velutina* (Castro et al., 2008). Sutili et al. (2014), demonstraram a atividade antimicrobiana moderada do óleo de cravo contra *A. hydrophila*. Extrato de alho foi eficaz contra bactérias Gram-positivas (*Streptococcus agalactiae*) e Gram-negativas (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Edwardsiella tarda*) (Wei e Musa, 2008).

No presente estudo, o extrato que apresentou maior atividade contra *A. hydrophila* foi o acetônico. Majolo et al. (2013), observaram que quanto maior o teor de bixina no extrato, maior sua atividade antibacteriana. A análise dos dados confirma que o teor de bixina foi maior no extrato extraído com acetona 100%, o que indica a importância da bixina na atividade antibacteriana.

No ensaio *in vivo*, o extrato demonstrou 100% de eficácia, resultado semelhante ao verificado por Boijink et al. (2011) em banho com óleo essencial de *Ocimum gratissimum* sobre Monogenea de tambaqui. Resultados semelhantes foram encontrados para *Carassius auratus* infestados por *Dactylogyrus intermedius* e tratados com os extratos metanólicos e acetato de etila de *Radix bupleuri chinensis* (Wu et al., 2011), aquosos e metanólicos de *Cinnamomum cassia*, metanólicos de *Lindera aggregata* e acetato de etila de *Pseudolarix kaempferi* (Ji et al., 2012). Boijink et al. (2015) também relataram redução no número de Monogenea em tambaqui após banho com eugenol.

Extratos de *B. orellana* apresentam várias atividades biológicas, incluindo antibacteriana, antioxidante e antiparasitária (Fleischer et al., 2003). Estudos fitoquímicos dessa planta revelaram a presença de

flavonoides, alcaloides e dos terpenoides geranilgeraniol e bixina (Fleischer et al., 2003; Braga et al., 2007). A análise de RMN confirmou a presença da bixina nos extratos, em especial do acetônico. Estudos relacionam os terpenoides com atividades antimicrobianas, visto que, substâncias mais lipofílicas, atravessam a membrana da superfície dos microrganismos podendo causar sua ruptura, conseqüentemente, matando esses patógenos (Liu et al., 2010).

No presente estudo, não houve mortalidade nos tambaquis após infecção com *A. hydrophila* e parasitados por *Anacanthorus spathulatus*. Estudos recentes demonstraram que *Ictalurus punctatus* parasitados por *Ichthyophthirius multifiliis* apresentaram maior mortalidade do que os peixes não parasitados após exposição por imersão à *Edwardsiella ictaluri* (Xu et al., 2012). Apesar de não ter havido mortalidade no presente estudo, a presença de parasitos pode servir como porta de entrada aumentando a carga bacteriana no peixe, como observado por Shoemaker et al. (2012) em *I. punctatus* parasitados por *I. multifiliis* e expostos à *E. Ictaluri*. Além disso, a infecção teve sucesso uma vez que nos animais infectados com a bactéria e não tratados com o extrato apresentaram hemorragias nos órgãos internos. Mortalidades após infecção bacteriana estão relacionadas a vários fatores, incluindo a virulência da cepa utilizada, a concentração inoculada e a resistência imunológica dos peixes. Além disso, os tambaquis estavam em condições ideais de qualidade de água, densidade de estocagem e nutrição, o que pode ter contribuído para sua sobrevivência.

Infecção por patógenos é um fator causador de estresse em peixes, que produz efeitos que ameaçam ou perturbam seu equilíbrio homeostático (Tavares-Dias e Moraes, 2004; Jerônimo et al., 2014). Por outro lado, o estresse também provoca um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas como ação compensatória e/ou adaptativa, habilitando o animal a superar ameaças. Uma das respostas inclui o aumento na taxa de absorção de oxigênio pelas brânquias, sendo os eritrócitos os responsáveis por esse transporte (Ranzani-Paiva et al., 2013). Portanto, o aumento no número de eritrócitos e na concentração de hemoglobina nos peixes do grupo controle e tratados com o extrato sugerem uma resposta adaptativa frente à infecção por patógenos.

Silva et al., 2012 observaram diminuição no percentual de hematócrito e número total de eritrócitos em híbrido de surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) infectados por *A. hydrophila*. Resultados semelhantes foram observados por Rehulka, (2002), em truta arco-iris após infecção por *A. hydrophila*. Por outro lado, Sutili et al. (2014), não detectaram alterações nos

parâmetros hematológicos e bioquímicos em jundiás infectados por *A. hydrophila* tratados e não tratados com óleo de cravo.

A glicose plasmática é uma resposta fisiológica utilizada como indicadora de estresse em peixes. Geralmente, há aumento nos níveis em situações desfavoráveis para suprir a maior demanda energética (Barton and Iwama, 1991; Fagundes et al., 2008). A princípio, o aumento na glicose verificado nos peixes tratados sugere uma condição de estresse desencadeada pelo extrato. Resultados semelhantes foram reportados em *O. niloticus* submetidas a banho com *Lippia sidoides* (Hashimoto et al. 2016), em *Oncorhynchus mykiss* submetidos a banhos com própolis (Talas and Gulhan, 2009), e em *C. carpio* submetidos a banhos com extrato de *M. oleifera* (Kavitha et al., 2012). Entretanto, o nível de glicose nos peixes pode ter sido influenciado pelos carotenoides presentes no extrato, como observado em outros animais. Bautista et al. (2004), avaliando a toxicologia subaguda em ratos machos, detectaram aumento significativo da glicemia após serem tratados com sementes de urucum (teor de bixina 27%). Resultados semelhantes foram encontrados também em ratos alimentados com extrato de urucum (teor de bixina 50%), e com norbixina purificada (Fernandes et al, 2002). Segundo Subczynski e Wisniewska (2000), os carotenoides podem interagir com a membrana das células, afetando a entrada de glicose. Isso pode ter causado diminuição na absorção da glicose pela célula, e conseqüentemente, hiperglicemia. Portanto, estudos são necessários para compreender a dinâmica de interação de carotenoides com as membranas celulares em peixes, e assim elucidar como a homeostase da glicose é afetada.

5. Conclusões

O presente estudo foi o primeiro a relatar a utilização do extrato das sementes de urucum contra parasitos Monogenea *A. spathulatus* e *A. hydrophila*. O tratamento apresentou 100% de eficácia em todas as concentrações e tempos testados. Embora o extrato tenha apresentado ação antibacteriana *in vitro*, não houve mortalidade no teste *in vivo*. Entretanto, os animais infectados com *A. hydrophila* não tratados com o extrato apresentaram hemorragias nos órgãos internos, diferente dos tratados.

6. Referências

- Arde, P.H.R., Roubach, R., Val, A.L., 2007. Tolerance response of tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. *Aquat. Bot.* 38, 588-594.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.* 1, 3-26.
- Bautista, A.R.P.L., Moreira, E.L.T., Batista, M.S., Miranda, M.S., Gomes, I.C.S., 2004. Subacute toxicity assessment of annatto in rat. *Food Chem. Toxicol.* 42, 625-629.
- Boijink, C.L., Inoue, L.A.K.A., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., 2011. Boas práticas de manejo na piscicultura para conservação da qualidade ambiental: Uso de produtos naturais como anti-helmíntico em tambaqui. *Anais do Seminário produtividade agropecuária e benefícios socioambientais das pesquisas da Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos 88 Embrapa Amazônia Ocidental*, pp. 41-45.
- Boyd, C.E., Tucker, C.S., 1992. Water quality and pond soil. Analyses for aquaculture. Auburn University. Auburn. Alabama, 183 pp.
- Braga, F.G., Bouzada, M.L. M., Fabri, R.L., Matos, M.O., Moreira, F.O., Scio, E., Coimbra, E.S., 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 111, 396-402.
- Bush, A.O, Lafferty, K.D, Lotz J.M, Shostak A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol* 1997; 83(4): 575-583.
- Costa, O.T.F.; Ferreira, D.J.S.; Mendonça, F.P.; Fernandes, M.N., 2004. Susceptibility of Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasaminae) to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture* 232, 627-636.
- Belem-Costa, A., Cyrino, J.E.P., 2006. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Sci. Agric.* 63, 281-284.
- Dotta, G., Brum, A., Jeronimo, G.T., Marschin, M., Martins, M.L., 2015. Effect of dietary supplementation with propolis and *Aloe barbadensis* extracts on hematological parameters and parasitism in Nile tilapia. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 24(1), 66-71.
- Fernandes, A.C.S., Almeida, C.A., Albano, F., Laranja, G.A.T., Felzenszwalb, I., Lage, C.L.S., Sa, C.C.N.F., Moura, A.S., Kovary,

- K., 2002. Norbixin ingestion did not induce any detectable DNA breakage in liver and kidney but caused a considerable impairment in plasma glucose levels of rats and mice. *J. Nutr. Biochem.* 13, 411–420.
- Fleischer, T.C., Ameadea, E.P.K., Mensaha, M.L.K., Sawer, I.K., 2003. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia* 74, 136-138.
- Forwood, J.M., Harris, J.O., Deveney, M.R., 2013. Efficacy of current and alternative bath treatments for *Lepidotrema bidyana* infecting silver perch, *Bidyanus bidyanus*. *Aquaculture* 416-417, 65-71.
- Fu, Y.W., Zhang, Q.Z., Xu, D.H., Xia, H., Cai, X.X., Wang, B., Liang, J.H., 2014. Parasiticidal effects of *Morus alba* root bark extracts against *Ichthyophthirius multifiliis* infecting grass carp. *Dis. Aquat. Org.* 108, 129-136.
- Gomes, A.L., Bernardino, G., Costa, A.B., Corrêa, M.A., Feitosa, C.P., 2012. Investigação sanitária de peixes cultivados no Estado do Amazonas. *Anais do V Aquaciência*, Palmas, Tocantins, pp. 1-5.
- Ghiraldelli, L., Martins, M.L., Yamashita, M.M., Jerônimo, G.T., 2006. Ectoparasites influence on the haematological parameter of Nile tilapia and carp cultured in the state of Santa Catarina, south Brazil. *J. Fish. Aquat. Sci.* 3, 270-276.
- Hashimoto, G.S.O., Neto, F.M., Ruiz, M.L., Acchile, M., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Martins, M.L., 2015. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture* 450, 182-186.
- Jerônimo, G.T., Laffitte, L.V., Speck, G.M., Martins, M.L., 2011. Seasonal influence on the hematological parameters in cultured Nile tilapia from southern Brazil. *Braz. J. Biol.* 71, 719–725.
- Jerônimo, G.T., Pádua, S.B., Bampi, D., Gonçalves, E., Garcia, P., Ishikawa, M. M.; Martins, M.L. 2014. Haematological and histopathological analysis in South American fish *Piaractus mesopotamicus* parasitized by monogenean (Dactylogyridae). *Braz. J. Biol.* 74(4), 1000-1006.
- Ji, J., Lu, C., Kang, Y., Wang, G.X., Chen, P., 2012. Screening of 42 medicinal plants for in vivo anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol. Res.* 111, 97-104.
- Kavitha, C., Ramesh, M., Kumaran, S.S., Lakshmi, S.A., 2012. Toxicity of *Moringa oleifera* seed extract on some hematological and

- biochemical profiles in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. Exp. Toxicol. Pathol. 64, 681-687.
- Kritsky, D.C., Thatcher, V.E., Kayton, R.J., 1979. The Anacanthorinae Price, 1967, with the proposal of four new species of Anacanthorus Mizelle & Price, 1965, from Amazonian fishes. Acta Amaz. 9, 355-361.
- Kumar, A., Prasad, M.R., Mishra, D., Srivastav., SK, Srivastav, A.K., 2010. Toxicity of aqueous extract of *Euphorbia tirucalli* latex on catfish, *Heteropneustes fossilis*. Ecotoxicol. Environ. Safe. 73, 671-3.
- Levy, G., Zilberg, D., Paladinia, G., Fridman, S., 2015. Efficacy of ginger-based treatments against infection with *Gyrodactylus turnbulli* in the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). Vet. Parasitol. 209, 235-241.
- Liu, C., Zhou, H.B., Zhang, W.D., 2010. Terpenoids from Stems and Leaves of *Cupressus gigantean*. Chinese J. Nat. Med. 8, 405-410.
- Lôbo, K.M.S., Athayde, A.C.R., Silva, A.M.A., Rodrigues, F.F.G., Lobo, I.S., Bezerra, D.A.C., Costa, J.G.M., 2010. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam, e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F.Autin & Staples, do semiárido paraibano. Rev. Bras. Plan. Med. Botucatu 2, 227-233.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 512 pp.
- Lu, C., Zhang, H.-Y., Ji, J., Wang, G.-X., 2012. In vivo anthelmintic activity of *Dryopteris crassirhizoma*, *Kochia scoparia*, and *Polygala tenuifolia* against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). Parasitol. Res. 110, 1085-1090.
- Marcon, J.L., Moreira, S.S., Fim, J.D.I., 2004. Median lethal concentration (LC₅₀) for un-onized ammonia in two Amazonian fish species, *Colossoma macropomum* and *Astronotus ocellatus*. In: VI International Congress on the Biology of Fish. Manaus. 1, 105-116.
- Matyar, F., Akkan, T., Uçak, T., Uçak, Y., Eraslan, B., 2010. Aeromonas and Pseudomonas: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea), Environ. Monit. Assess. 167, 309-320.
- Monteiro, P.C., 2012. O uso do extrato aquoso de mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) no controle de monogenóideos (Platyhelminthes) em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Dissertação de Mestrado.

- Universidade Nilton Lins. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 90 pp.
- Natt, M.P., Herrick, C.A., 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Sci.* 31, 735-738.
- Pavanelli, G.C., Eiras, J.C., Takemoto, R.M. (Ed 3^a), 2008. Doenças de Peixes. Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento. Universidade Estadual de Maringá, 305 pp.
- Preston, H.D., Rickard, M.D., 1980. Extraction and chemistry of annatto. *Food Chem.* 5, 47-56.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I. (Ed. 1^a), 2013. Métodos para análise hematologia de peixes. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 142 pp.
- Rehulka, J., 2002. *Aeromonas* causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology and biochemistry. *Acta Vet Brno* 71, 351-360.
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P., 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture* 433, 50-61.
- Ritter, R.A., Monteiro, M.V.B., Monteiro, F.O.B., Rodrigues, S.T., Soares, M.L., Silva, J.C.R., Palha, M.D.C., Biondi, G.F., Rahal, S.C., Tourinho, M.M., 2012. Ethnoveterinary knowledge and practices at Colares island, Pará state, eastern Amazon, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 144, 346-352.
- Shoemaker, C.A., Martins, M.L., Xu, D.H., Klesius, P.H., 2012. Effect of *Ichthyophthirius multifiliis* parasitism on the survival, hematology and bacterial load in channel catfish previously exposed to *Edwardsiella ictaluri*. *Parasitol. Res.* 111, 2223-2228.
- Silva, B.C., Mouriño, J.L.P., Vieira, F.N., Jatobá, A., Seiffert, W.Q., Martins, M.L., 2012. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquac Res.* 43, 908-916.
- Subczynski, W.K., Wisniewska, A., 2000. Physical properties of lipid bilayer membranes: relevance to membrane biological functions. *Acta Biochim. Pol.* 47, 613-625.
- Suhet, M.I., Chocken-Iturrino, R.P., Amaral, L.A., 2011. Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por espécies de *Aeromonas* isoladas de criação intensiva de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Ars Veterinaria* 1, 36-44.

- Sutuli, F.J., Kreutz, L.C., Noro, M., Gressler, L.T., Heinzmann, B.M., Vargas, A.C., Baldisserotto, B., 2014. The use of eugenol against *Aeromonas hydrophila* and its effect on hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 154, 142-148.
- Talas, Z.S., Gulhan, M.F., 2009. Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1994-1998.
- Tocchini, L., Mercadante, A.Z., 2001. Extraction and determination of bixin and norbixin in annatto spice ("colorifico"). *Food Sci. Technol.* 21, 310-313.
- Tu, X., Ling, F., Huang, A., Zhang, Q., Wang, G., 2013. Anthelmintic efficacy of *Santalum album* (Santalaceae) against monogenean infections in goldfish. *Parasitol. Res.* 112, 2839-2845.
- Verdouw, H., Van Eched, C.J.A., Dekkers, E.M.J., 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium silicylate. *Water Res.* 6, 397-402.
- Wang, Y., Wu, Z.F., Wang, G.X., Wang, F., Liu, Y.T., Li, F.Y., Han, J., 2010. In vivo anthelmintic activity of bruceine A and bruceine D from *Brucea javanica* against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Vet. Parasitol.* 177, 127-133.
- Wintrobe, M.M., 1934. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematol.* 51, 32-49.
- Wu, Z.F., Zhu, B., Wang, Y., Lu, C., Wang, G.X., 2010. In vivo evaluation of anthelmintic potential of medicinal plant extracts against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol. Res.* 108, 1557-1563.
- Xu D-H, Shoemaker CA, Martins ML, Pridgeon JW, Klesius PH., 2012. Enhanced susceptibility of channel catfish to the bacterium *Edwardsiella ictaluri* after parasitism by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Vet. Microbiol.* 158(1-2), 216-219.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do extrato acetônico de sementes de urucum *Bixa orellana* em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* infectados por patógenos. Os resultados do primeiro ensaio, onde foi avaliada a eficácia *in vitro* e *in vivo* do extrato contra parasitos Monogenea braquiais de tambaqui e sua influência sobre os parâmetros sanguíneos e bioquímicos, mostrou que o extrato possui 100% de eficácia antiparasitária em todas as concentrações e tempos testados. Entretanto, alterações bioquímicas como o aumento na glicose plasmática foram detectadas, o que no primeiro momento foi visto como um estresse causado pelo extrato. Entretanto, não houve aumento nos níveis de cortisol plasmático em peixes tratados com o extrato. Sabendo-se que a glicose é afetada por outros fatores, e que os carotenóides influenciam na absorção de glicose por meio de alterações na membrana das células, sugerere-se novos estudos a fim de elucidar a real causa dessas alterações. Além disso, também novos estudos com concentrações menores de extratos e diferentes tempos de banho talvez seja possível obter a mesma eficácia com menores concentrações de extrato, podendo minimizar as alterações fisiológicas e os custos de produção.

No segundo ensaio foram avaliados os parâmetros sanguíneos de *Colossoma macropomum* tratados com extrato das sementes de *B. orellana* após infecção por *Aeromonas hydrophila* e Monogenea. O extrato apresentou atividade antibacteriana e anti-helmíntica *in vitro* contra os patógenos. O extrato acetônico apresentou concentração inibitória mínima de (MIC) de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *A. hydrophila* no teste *in vitro*, e 100% de eficácia antiparasitária no teste *in vivo* em todas as concentrações e tempos avaliados. A infecção com *A. hydrophila* não causou mortalidade nos tambaquis, mas o exame macroscópico interno revelou ascite e fígado, rim e baço com aspecto hemorrágico. Entretanto, nos peixes tratados com o extrato, não foram detectados estes sinais clínicos. Portanto, novos estudos deverão ser realizados para avaliar a real eficácia antibacteriana.

Além da elevada eficácia antiparasitária, o extrato não causou mortalidade no experimento de toxicidade. Esses resultados sugerem o grande potencial do urucum para o tratamento de enfermidades em peixes. Portanto, novos estudos como o mecanismo de ação antimicrobiana, isolamento de substâncias bioativas e avaliações de impacto sobre os ambientes naturais devem ser realizadas antes de sua utilização em sistemas de criação.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

AGNER, A.R.; BARBISAN, L.F.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D.M.F. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver médium-term assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 10, p. 1687-1693, 2004.

AKINBOWALE, O.L.; PENG, H.; GRANT, P.; BARTON, M.D. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 177-182, 2007.

ALVES DE LIMA, R. O., AZEVEDO, L., RIBEIRO, L. R. SALVADORI, D.M.F. Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 2, p. 189-192.

ARAÚJO-LIMA, C.; GOLDING, M. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, DF, 186pp, 1998.

BELÉM-COSTA, A., CYRINO, J.E.P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Scientia Agricola* 63, 281-284, 2006.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 396-402, 2007.

BUSCH, S., DALSGAARD, I., BUCHMANN, K. Concomitant exposure of rainbow trout fry to *Gyrodactylus dejarvini* and *Flavobacterium psychrophilum*: effects on infection and mortality of host. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 117-122, 2003.

BUSH, A.O., LAFFERTY, K.D., LOTZ, J.M., SHOSTAK, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 4, p. 575-583, 1997.

CHAGAS, E. C. GOMES, L. C.; JUNIOR, H. M.; ROUBACH, R. Produtividade de tabaqui criado em tanque-rede com diferentes taxas de alimentação. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1109-1115, 2007.

CHRISTYBAPITA, D.; DIVYAGNANESWARI, M.; DINAKARAN MICHAEL, R. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 840-852, 2007.

CLAUDIANO, G.S.; DIAS NETO, J.; SAKABE, R.; CRUZ, C.; SALVADOR, R., PILARSKI, F. Eficácia do extrato aquoso de *Terminalia catappa* em juvenis de tabaqui parasitados por monogenéticos e protozoários. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 3, p. 625-636, 2009.

COELHO, A.M.S.P.; SILVA, G.A.; VIEIRA, O.M.C.; CHAVASCO, J.K. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). **Revista Lecta**, v. 21, p. 47-54, 2003.

COSTA, E.V.Ç.; TEIXEIRA, S.D.; MARQUES, F.A.; DUARTE, M.C.T.; DELARMELENA, C.; PINHEIRO, M.L.B.; TRIGO, J.R.; MAIA, B.H.L.N.S.M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon Guatteriopsis species. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1895–1899, 2008.

COSTA, S.W.; VICENTE, L.R.M.; SOUZA, T.M.; ANDREATTA, E.R.; MARQUES, M.R.F. Parâmetros de cultivo e a enfermidade da mancha-branca em fazendas de camarões de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.12, p. 1521-1530, 2010.

CHISTÉ, R.C.; MERCADANTE, A.Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J.L.F.C.; BRAGAGNOLO, N. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 127, p. 419–426, 2011.

COHEN, S.C.; KOHN, A. A new species of *Mymarothecium* and new host and geographical records for *M. viatorum* (Monogenea:

Dactylogyridae), parasites of freshwater fishes in Brazil. **Folia Parasitologica**, v. 52, p. 307–310, 2005.

EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R.M; PAVANELLI, G.C. **Diversidade dos parasitas de peixes de água doce do Brasil**. Maringá: Clichetec, 333pp, 2010.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture: *Fisheries Department*. Roma, 209pp, 2012.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture: *Fisheries Department*. Roma, 223pp, 2014.

FISCHER, C.; MALTA, J.C.O.; VARELLA, A.M.B. A fauna de parasitas do tambaqui, *Colosoma macropomum* (Curvier, 1818) (Characiformes: Chracidae) do médio rio Solimões, Estado do Amazonas (AM) e do baixo rio Amazonas, estado do Pará (PA), e seu potencial como indicadores biológicos. **Acta Amazonica**, v. 4, p. 651-662, 2003

FLEISCHERA, T.C., AMEADEA, E.P.K.; MENSAHA M.L.K.; SAWER, I.K. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 136–138, 2003.

GHIRALDELLI, L.; MARTINS, M.L.; YAMASHITA, M.M.; JERÔNIMO, G.T. Ectoparasites influence on the haematological parameters of Nile tilapia and carp cultured in the State of Santa Catarina, South Brazil. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 1, n. 3, p. 270-276, 2006.

GOMES, A.L.; BERNARDINO, G.; COSTA, A.B.; CORRÊA, M.A.; FEITOSA, C.P. Investigação sanitária de peixes cultivados no Estado do Amazonas. *Anais do V Aquaciência*, Palmas, TO, 1-5 de julho. 2012.

GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; CHIPPARI-GOMES, A.R. ; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M. E URBINATI, E.C. Effect of fish density on the stress physiological responses and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum* during transportation. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 34, n. 1, p. 76-84, 2003.

GOMES, M.F.; SILVA, V. T. B.; LAVERDE JR, A.; TAKEMURA, O. S. Avaliação da atividade antioxidante de extratos das folhas de *Bixa orellana* (Bixaceae) e *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 12, n. 3, p. 169-173, 2008.

HARIKRISHNAN, R.; NISHA RANI, M.; BALASUNDARAM, C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture**, v. 221, p. 41-50, 2003.

HASHIMOTO, G.S.O.; NETO, F.M.; RUIZ, M.L.; ACCHILE, M.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; MARTINS, M.L. 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.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994.

IDAM. Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Amazonas. 2013.

JERÔNIMO, G.T.; SPECK, G.M.; MARTINS, M.L. First report of *Enterogyrus cichlidarum* Paperna 1963 (Monogenoidea: Ancyrocephalidae) on Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in Brazil. **Neotropical Helminthology**, v. 4, n. 1, p. 75-80, 2010.

KUBITZA, F.; CAMPOS, J.L.; ONO, E.A. ISTCHUK, P.E. Panorama da Piscicultura no Brasil (Parte I). Estatísticas, espécies, pólos de produção e fatores limitantes à expansão da atividade. **Panorama da Aquicultura**, 132: 14-25, 2012.

KUMAR, S., RAMAN, R.P., PANDEY, P.K., MOHANTY, S., KUMAR, A., KUMAR, K. Effect of orally administered azadirachtin on non-specific immune parameters of goldfish *Carassius auratus* (Linn. 1758) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. **Fish Shellfish Immunology**. 34, 564–573, 2013.

LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; VARGAS, L.D.M.; POVEDA-PARRA, A.R.; DIGMAYER, M. 2011. As principais espécies produzidas no Brasil, 143-215. In: Lopera-Barrero, N.M.; Ribeiro, R.P.; Povh, J.A.; Vargas, L.D.M.; Poveda-Parra, A.R.; Digmayer, M. *Produção de organismos aquáticos: uma visão geral no Brasil e no mundo*. Agrolivros, Guaíba.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Oessa SP: Instituto Plantarum, 544p, 2002.

MAJOLO, C. Atividade antibacteriana *in vitro* de diferentes acessos de *Bixa orellana* L. (urucum) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes. Dissertação curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 57p, 2009.

MALTA, J.C.O.; GOMES, A.L.S.; ANDRADE, S.M.S.; VARELLA, A.M.B. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* GOLVAN, 1956, (EOACANTHOCEPHALA, NEOECHINORHYNCHIDAE) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) cultivados na Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 31: 133-143, 2001.

MARTINS, M.L., MOURIÑO, J.L.P., AMARAL, G.V., VIEIRA, F.N., DOTTA, G., BEZERRA, A.J.M., PEDROTTI, F.S., JERÔNIMO, G.T., BUGLIONE-NETO, C.C., PEREIRA JR., G. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 631–637, 2008.

MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R.; BOZZO, F.R.; PAIVA, A.M.F.C.; GONÇALVES, A. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the state of São Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum Maringá**, v. 4, p. 981-985, 2002.

MAXIMIANO, A.A.; FERNANDES, R.O.; NUNES, F.P.; ASSIS, M.P.; MATOS, R.V.; BARBOSA, C.G.S.; OLIVEIRA-FILHO, E.C.

Use of veterinary drugs and pesticides in the aquatic environment: demands, regulation and concerns on risks to human and environmental health. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 10, p. 483-491, 2005.

MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI. Biodiversidade da Amazônia Online. <http://www.museu-goeldi.br/biodiversidade/index.asp>. Acessado em: 17 de maio 2015.

MPA - Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Brasília, 60pp, 2011.

MPA - Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Brasília, 128pp, 2013.

OKPEKON, T.; YOLOU, S.; GLEYE, C.; ROBLLOT, F.; LOISEAU, P.; BORIES, C.; GRELLIER, P.; FRAPPIER, F.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 91–97, 2004.

OLIVEIRA, D.F.; PEREIRA, A.C.; FIGUEIREDO, H.C.P.; CARVALHO, D.A.; SILVA, G.; NUNES, A.S.; ALVES, D.S.; CARVALHO, H.W.P. Carvalho. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. **Fitoterapia**, v. 78, p. 142–145, 2007.

ONAKA, E.M.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. 2003. Eficácia do Albendazol e praziquantel no controle de *Anacanthorus penilabiatius* (Monogenea: Dactylogyridae), parasitos de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, n. 2, p. 101–107, 2003.

ONO, E. A. Cultivar peixes na Amazônia: possibilidade ou utopia? **Panorama da Aquicultura**, v. 15, n. 90, p. 41-48, 2005.

PARK, K.-H., CHOI, S.-H. The effect of mistletoe, *Viscum album coloratum*, extract on innate immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish Shellfish Immunology**, 32, 1016–1021, 2012.

PAUMGARTEN, F. J. R., CARVALHO, R. R., ARAÚJO, I. B. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 40, n. 11, p. 1595–1601, 2002.

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

PILARSKI, F.; ROSSINI, A. J.; CECCARELLI, P. S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, v. 68, n. 2, p. 409-414, 2008.

RADU, S.; AHMAD, N.; LING, F.H.; REEZAL, A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 261-266, 2003.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens. **Fitoterapia**, v. 78, p. 434-436, 2007.

SALTON, R.; SCHICK, S. *Aeromonas hydrophila* peritonitis. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 57, p. 489-491, 1973.

SANTOS, E. F.; TAVARES-DIAS, M.; PINHEIRO, D. A.; NEVES, L. R.; MARINHO, R. G. B.; DIAS, M. K. R. Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanque-rede no Estado do Amapá, Amazônia Oriental. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 43, n.1, p. 106-112, 2013.

SANTOS, G.M., FERREIRA, E., ZUANON, J. **Peixes Comerciais de Manaus**. Manaus: IBAMA/AM, Provárzea. 144p, 2006.

SAHU, S.; KUMAR DAS, B.; PRADHAN, J.; MOHAPATRA, B.C.; MISHRA, B.K.; SARANGI N. Effect of *Magnifera indica* kernel as a feed additive on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* fingerlings. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 109-118, 2007.

SEPA - Secretaria Executiva de Pesca e Aquicultura. I SEMINÁRIO ESTADUAL DE ARRANJOS PRODUTIVOS LOCAIS. SEPLAN/NEAPL, Manaus, 2013.

SILVA, C.R.; GOMES, L.C.; BRANDAO, F.R. Effect of feeding rate and frequency on tambaqui (*Colossoma macropomum*) growth,

production and feeding costs during the first growth phase in cages. **Aquaculture**, v. 264, p. 135-139, 2007.

SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L.P.; VIEIRA, F.N.; JATOBÁ, A.; SEIFFERT, W.Q.; MARTINS, M.L. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture research**, v. 43, p. 908-916, 2012.

TAKEMOTO, R.M.; PEREZ-LIZAMA, M.L.A.; GUIDELLI, G.M.; PAVANELLI, G.C. Parasitos de peixes de águas continentais. In: Ranzani-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M.de los A. *Sanidade de Organismos Aquáticos*. Editora São Paulo. p. 177 – 198, 2004.

TANG, J.; CAI, J.; LIU, R.; WANG, J.; LU, Y.; WU, Z.; JIAN, J. Immunostimulatory effects of artificial feed supplemented with a Chinese herbal mixture on *Oreochromis niloticus* against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, 39: 401-406, 2014.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “Pesque-Pesque” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 19, n. 1, p. 103-110, 2003.

TAVECHIO, W. L.G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335-341, 2009.

THATCHER V.E. Amazon fish parasites. Sofia-Moscow: Pensoft, 508pp, 2006.

THUNE, R.L.; STANLEY, L. A.; COOPER, R.K. Pathogenesis of gran-negative bacterial infections in warmwater fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 3, p. 37-68, 1993.

VAL, L. A.; HONCZARYSK, A. 1995. *Criando peixes na Amazônia*. MCT/INPA. Manaus, Amazonas, Brasil. 160pp.

VARELLA, A.M.B.; PEIRO, S.N.; MALTA, J.C.O.; LOURENÇO, J.N.P. Monitoramento da parasitofauna de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Osteichthyes: Characidae) cultivado em tanques-rede

em um lago de varzea na Amazônia, p. 95-106. In: Urbinati, E.C.; Cyrino, J.E.P. (Eds.). *XII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura*. AQUABIO, Jaboticabal, São Paulo. 2003.

XU, D.H.; SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H. Enhanced mortality in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following coinfections with ichthyophthiriasis and streptococcosis. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 85, p. 187-192, 2009.

ANEXO I



(A)



(B)



(C)

Figura 1: Processo de preparação dos extratos. (A) Extração das sementes em banho de ultrasson; (B) Filtragem do extrato; (C) Concentração do extrato em rotaevaporador.

ANEXO II



Figura 2: Teste de atividade antiparasitária *in vitro* do extrato acetônico de urucum contra *Monogenea*.

ANEXO III



Figura 3: Teste *in vivo* - Banho com o extrato acetônico de urucum contra *Monogenea*.

ANEXO IV



(A)



(B)



(C)

Figura 4: Sinais clínicos dos tambaquis tratados e não tratados com extrato acetônico das sementes de urucum após desafio com *Aeromonas hydrophila*. (A) Peixe não tratado, seta preta indicando acúmulo de líquido na cavidade celomática. (B) Peixe não tratado, seta preta indicando fígado com coloração anormal e friável. (C) Órgãos dos peixes do grupo tratado com extrato (125 µg/mL por 12 horas) com aspecto saudável.