



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

BIANCA NATALLY VIANA SERRA

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia* spp. NO CONTROLE DO ESTÁGIO  
INICIAL DO ACANTOCÉFALO *Neoechinorhynchus buttnerae*,  
ENDOHELMINTO DE TAMBAQUI *Colossoma macropomum***

Florianópolis

2019

Bianca Natally Viana Serra

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia* spp. NO CONTROLE DO ESTÁGIO INICIAL DO  
ACANTOCÉFALO *Neoechinorhynchus buttnerae*, ENDOHELMINTO DE TAMBAQUI  
*Colossoma macropomum*.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Laterça Martins  
Coorientadora: Dra. Gabriela Tomas Jerônimo

Florianópolis

2019

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

Serra, Bianca Natally Viana

Óleos essenciais de *Lippia* spp no controle do estágio inicial do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*, endohelminto de tambaqui *Colossoma macropomum* / Bianca Natally Viana Serra ; orientador, Maurício Laterça Martins, coorientadora, Gabriela Tomas Jerônimo, 2019.

47 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Fitoterápicos. 3. Acantocefalose. 4. Ovicida. I. Martins, Maurício Laterça. II. Jerônimo, Gabriela Tomas. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Bianca Natally Viana Serra

**Óleos essenciais de *Lippia* spp. no controle do estágio inicial do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*, endohelminto de tambaqui *Colossoma macropomum*.**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Maurício Laterça Martins, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Felipe do Nascimento Vieira, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Jaqueline Inês Alves de Andrade, Dr<sup>a</sup>.  
Instituto Federal Catarinense, Campus Araquari.

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Aquicultura.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leila Hayashi.  
Coordenadora do programa

---

Prof. Dr. Maurício Laterça Martins  
Orientador

Florianópolis, 22 de julho de 2019.

*Este trabalho é dedicado à minha mãe, Geane Serra, meu maior incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter sido minha fortaleza em momentos que achei que não fosse capaz de seguir sozinha com o mestrado e por ter me mostrado que, enquanto eu estiver junto Dele, tudo é perfeitamente realizável. Gratidão, Pai.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Maurício Laterça Martins, que aceitou a orientação e me deu a oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço também aos professores colaboradores da Embrapa Amazônia Ocidental, Edsandra Campos Chagas e Francisco Célio Maia Chaves, que me acolheram tão bem e deram todo suporte necessário.

À minha coorientadora e amiga pessoal Gabriela Tomas Jerônimo, que esteve ao meu lado durante todo o processo e me aconselhou, me ajudou, me advertiu e, principalmente, confiou em mim com todo coração.

À minha mãe Geane Serra e às minhas irmãs Mayara e Karine que, como sempre, depositaram toda a confiança em mim, e mesmo de longe se fizeram presentes, proferindo palavras carinhosas de incentivo e de amor. E ao meu pai, que foi pra junto de Deus no meio deste processo, mas me deixou a lembrança de nunca desacreditar de mim mesma, sob qualquer circunstância.

Ao meu namorado Heleno que, com o maior carinho do mundo, me deu apoio e atenção a todo o tempo, sempre me cuidando, escutando e compreendendo. Gratidão por toda essa leveza que você me traz, amor.

A todos os componentes do Laboratório AQUOS – Sanidade de Organismos Aquáticos da Universidade Federal de Santa Catarina, que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Aos técnicos e alunos do Laboratório de piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, em especial à cativante professora Maria Inês de Oliveira Braga, por sempre ter sido tão solícita e me esclarecido dúvidas quando precisei, me proporcionado uma rica troca de conhecimento e experiências. Muito obrigada por tudo mesmo.

Aos meus amigos manauaras, Adrielly da Silva, Matheus Gomes e Lorena Vieira que me apoiaram em tempo integral e que contribuíram diretamente na execução desse trabalho, seja ajudando no laboratório ou dando suporte emocional.

Por fim, á todas as pessoas que passaram pela minha vida enquanto estive em Florianópolis, Natália Palhoza, Lúvia de Sá, Raphaela Paiva, Marcos J, Camila Lisarb e a todos os outros que facilitaram a minha estadia na cidade e me ajudaram em algum momento.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil - (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante”*

(Saint-Exupéry – O pequeno príncipe)

## RESUMO

As perdas econômicas causadas pelo acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* vêm se intensificando nos últimos anos nas pisciculturas de tambaqui *Colossoma macropomum* no norte do país, sendo que a utilização indiscriminada de quimioterápicos para controle dessa parasitose é cada vez mais recorrente. Considerando a necessidade de tratamentos alternativos que sejam efetivos e ambientalmente amigáveis e a escassez de conhecimento sobre características morfológicas dos ovos de acantocéfalo, este estudo objetivou avaliar o efeito dos óleos essenciais de *Lippia alba*, *Lippia sidoides* e *Lippia gracilis* sobre a inviabilização de ovos de *Neoechinorhynchus buttnerae* e elucidar os aspectos morfológicos dos ovos afim de contribuir para o conhecimento dessa fase inicial do parasito. Para tanto, dez tambaquis naturalmente parasitados por *N. buttnerae* foram estocados em caixas d'água e mantidos no laboratório para posterior eutanásia e realização dos testes. Após a dissecação dos peixes, o intestino inteiro foi retirado e colocado em placa de Petri contendo solução de NaCl 0,9%. Os parasitos foram retirados com auxílio de pinças e sexados de acordo com suas características morfológicas. As fêmeas selecionadas foram colocadas em placa de Petri e, para a liberação dos ovos, uma pequena ruptura foi feita na parte anterior do parasito. Utilizou-se uma solução de *pool* de ovos de 10 fêmeas para cada tratamento. Um volume de 200  $\mu\text{L}$  da solução foi adicionado em cada uma das unidades experimentais, que consistiam em placa de 12 poços contendo as diluições dos óleos essenciais: 0,5; 1; 2; 5 e 10  $\text{mg mL}^{-1}$ , além de uma unidade controle somente com água e Tween<sup>®</sup> 3%, meio diluente dos óleos. Após 24 h de incubação a 28°C, os ovos foram corados com eosina e classificados em inviáveis, viáveis e eclodidos para contagem. Os ovos (N=300) foram mensurados (comprimento: largura) em microscópio óptico com o auxílio de um programa digital. Os resultados demonstraram que os ovos de acantocéfalo possuem três envoltórios protegendo a larva acântor e que estruturas primárias podem ser observadas nesta fase inicial de vida do parasito. O óleo essencial de *L. alba* apresentou baixa eficácia para o controle de ovos de *N. buttnerae*, alcançando menos de 35% do total. Por outro lado, o óleo essencial de *L. gracilis* apresentou 100% de eficácia na maior concentração, ao passo que o óleo de *L. sidoides* alcançou uma eficácia de mais de 50% já na concentração de 2  $\text{mg mL}^{-1}$ , chegando a 100% de eficácia em um efeito dose dependente.

**Palavras-chave:** Aquicultura. Fitoterápicos. Acantocefalose. Ovicida.

## ABSTRACT

The economic losses caused by the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* have been intensifying in the last years in tambaqui *Colossoma macropomum* fish farmings in the north of the country, and the indiscriminate use of chemotherapeutic agents to control this parasitosis is increasingly recurrently. The objective of this study was to evaluate the effect of the essential oils of *Lippia alba*, *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* on the impoverishment of eggs of *Neoechinorhynchus buttnerae*, besides elucidating the morphological aspects of these eggs in order to contribute to the knowledge of this initial phase of the parasite. To that end, ten tambaquis naturally parasitized by *N. buttnerae* were stored in water tanks and kept in the laboratory for later euthanasia and testing. After dissecting the fish, the entire intestine was removed and placed in Petri dish containing 0.9% NaCl solution. The parasites were removed using tweezers and sexed according to their morphological characteristics. The selected females were placed in Petri dish and, for the release of the eggs, a small rupture was made in the anterior part of the parasite. An egg pool solution of 10 females was used for each treatment. A 200  $\mu\text{L}$  volume of the solution was added in each of the experimental units, which consisted of a 12-well plate containing the dilutions of the essential oils: 0.5; 1; 2; 5 and 10 mg mL<sup>-1</sup>, plus a control unit only with water and Tween<sup>®</sup> 3%, diluent medium of the oils. After 24 h of incubation at 28 ° C, the eggs were stained with eosin and classified as unviable, viable and hatched for counting. Some eggs (N = 300) were separated and measured (length: width) under an optical microscope with the aid of a digital program. The results showed that the acanthocephalan eggs have three shells protecting the acanthor and that primary structures can be observed in this initial phase of life of the parasite. The essential oil of *L. alba* did not present satisfactory effectiveness for the control of eggs of *N. buttnerae*, reaching less than 35% of the total. On the other hand, the essential oil of *L. gracilis*, although not having a dose-dependent effect, showed 100% efficacy at the highest concentration, whereas *L. sidoides* oil reached an efficiency of more than 50% already at the concentration of 2 mg mL<sup>-1</sup>, reaching 100% efficacy in a dose dependent effect.

**Keywords:** Aquaculture. Phytotherapics. Acanthocephalosis. Ovicidal.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ciclo de vida do *Neoechinorhynchus buttnerae* esquematizado. As fezes dos peixes contendo os ovos do parasito são liberadas no meio ambiente e posteriormente ingeridos pelo hospedeiro intermediário ostracoda (*Cypridopsis vidua*). A larva acântor contida dentro do ovo, eclode no lúmen intestinal do HI, onde se fixa e passa por sucessivos estágios ontogênicos até alcançar a fase infectante ao hospedeiro definitivo, cistacanto, que por sua vez segue seu desenvolvimento dentro do intestino do peixe. (Adaptado de LOURENÇO et al., 2018) ..... 16
- Figura 2** - A-*Lippia gracilis*, B-*Lippia sidoides* e C-*Lippia alba* (Verbenaceae). ..... 20
- CAPÍTULO 1:**
- Figura 1** - Composição química do óleo essencial de *Lippia alba* obtida por cromatografia acoplada à espectrometria de massa..... 28
- Figura 2** - Composição química do óleo essencial de *Lippia sidoides* obtida por cromatografia acoplada à espectrometria de massa ..... 28
- Figura 3** - Composição química do óleo essencial de *Lippia gracilis* obtida por cromatografia acoplada à espectrometria de massa ..... 29
- Figura 4** - Ovos do acantocéfaló *Neoechinorhynchus buttnerae*. Foto autoral ..... 30
- Figura 5** - Ovo de *N. buttnerae* contendo larva acântor com os três envoltórios aparentes. A: Membrana externa; B: Membrana de fertilização; C: Membrana interna. Foto autoral ..... 31
- Figura 6** - Ovos de *Neoechinorhynchus buttnerae* corados com eosina básica. A: íntegros; B: inviáveis; C: Acântores eclodidos ..... 31
- Figura 7** - Efeito do óleo essencial de *Lippia gracilis* na integridade de membrana, eclosão e mortalidade de ovos de acantocéfaló. Letras diferentes representam diferença entre concentrações ..... 32
- Figura 8** - Efeito do óleo essencial de *Lippia gracilis* na integridade de membrana, eclosão e mortalidade de ovos de acantocéfaló. Letras diferentes representam diferença entre concentrações ..... 33
- Figura 9** - Eficácia (%) do óleo essencial de *Lippia sidoides* sobre a inviabilização dos ovos de *Neoechinorhynchus buttnerae* ..... 33

<b>Figura 10</b> - Eficácia (%) do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> sobre a inviabilização dos ovos de <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> .....	<b>34</b>
<b>Figura 11</b> - Eficácia (%) do óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> sobre a inviabilização dos ovos de <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> .....	<b>35</b>

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	13
1.1.1	<b>Panorama geral da aquicultura no Brasil</b> .....	<b>13</b>
1.1.2	<b>Tambaqui</b> ( <i>Colossoma macropomum</i> Cuvier, 1818).....	<b>14</b>
1.1.3	<b>Filo Acanthocephala</b> .....	<b>14</b>
1.1.3.1	<i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> (Golvan, 1956) .....	15
1.1.4	<b>Tratamentos convencionais para parasitos helmintos em peixes</b> .....	<b>17</b>
1.1.5	<b>Óleos essenciais e seu emprego na aquicultura</b> .....	<b>18</b>
1.1.5.1	Óleos essenciais de <i>Lippia</i> spp. (Verbenaceae).....	19
1.1.6	<b>Atividade ovicida dos óleos essenciais</b> .....	<b>21</b>
1.2.	OBJETIVOS.....	21
1.2.1	<b>Geral</b> .....	<b>21</b>
1.2.2	<b>Específicos</b> .....	<b>21</b>
<b>2.</b>	<b>CAPÍTULO 1: ATIVIDADE OVICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE</b> <i>Lippia alba</i> , <i>Lippia sidoides</i> e <i>Lippia gracilis</i> <b>SOBRE O ACANTOCÉFALO</b> <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> <b>(EOACANTHOCEPHALA:</b> <b>NEOECHINORHYNCHIDAE)</b> .....	<b>22</b>
	ABSTRACT .....	23
	RESUMO .....	23
2.1	INTRODUÇÃO.....	24
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.2.1	<b>Extração e caracterização dos óleos essenciais de</b> <i>Lippia alba</i> , <i>Lippia sidoides</i> e <i>Lippia gracilis</i> .....	<b>25</b>
2.2.2	<b>Hospedeiros e parasitos</b> .....	<b>26</b>
2.2.3	<b>Delineamento experimental</b> .....	<b>27</b>
2.2.4	<b>Análise estatística</b> .....	<b>27</b>
2.3	RESULTADOS .....	27
2.4	DISCUSSÃO.....	35
2.5	AGRADECIMENTOS .....	38
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>42</b>
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL .....	43

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1.1.1 Panorama geral da aquicultura no Brasil

A atividade da aquicultura no Brasil aumentou significativamente nos últimos anos, com produção atingindo um valor anual de 4,1 bilhões de dólares em 2016, sendo 77% correspondentes às 485.237 toneladas obtidas da atividade de criação (IBGE, 2017). Considerando o aumento da demanda pela proteína de peixe e a estagnação da atividade de pesca extrativista, que se mantém desde a década de 1990 (FAO, 2014a), a aquicultura a nível global tornou-se uma alternativa viável para aumentar a oferta e suprir a demanda de peixes, sendo o setor alimentício mais dinâmico, registrando taxa de crescimento médio anual de 13,4% nas últimas três décadas (TAVARES-DIAS e MARTINS, 2017).

A divergência climática entre as regiões brasileiras facilita a criação de diferentes espécies que sobrevivem em diferentes condições de cultivo em sistemas intensivos e semi intensivos. Segundo o Anuário Brasileiro da Piscicultura (2019), da Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR), o volume da criação de peixes no país alcançou 722 mil toneladas, 4,5% a mais do que as 691.700 toneladas de 2017. A tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* é um dos principais peixes cultivados no Brasil, sendo responsável por 400.280 toneladas dos peixes cultivados em 2018, com crescimento de 11,9% em relação ao ano anterior. O Paraná lidera o ranking nacional, com 123.000 toneladas/ano (29,3% do total), seguido de São Paulo (69.500 toneladas) e Santa Catarina (33.800 toneladas) (PEIXEBR, 2019).

Com relação a região norte do país, a produção de peixes nativos é liderada por Rondônia, com 72.800 toneladas produzidas, representando 39,4% da produção nacional total. O estado do Amazonas ocupa o 4º lugar, produzindo 15 toneladas de peixes, sendo o município de Rio Preto da Eva o principal centro produtor regional de pescado (PEIXEBR, 2019). No ano de 2016, o estado do Amazonas, contribuiu com 21.079 mil toneladas, e grande parte dessa produção é constituída pela criação e engorda de tambaqui em viveiros escavados (IBGE, 2017). Os principais produtores de peixes do Amazonas estão concentrados nos municípios do Amazonas, como Itacoatiara, Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva que são responsáveis pela criação de matrinxã *Brycon cephalus*, pirarucu *Arapaima gigas* e o tambaqui *Colossoma macropomum* (GANDRA, 2010)

### 1.1.2 Tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818)

O tambaqui é a espécie mais importante para a economia da região norte e é consolidada como a segunda mais cultivada no país, sendo responsável por 39,8% (287.910 ton.) de toda a produção nacional, atrás somente da exótica tilápia-do-nilo (PeixeBR, 2019). Tais números se devem às boas características zootécnicas dessa espécie que favorecem sua produção, como a resistência aos manejos e doenças; fácil aceitação de ração comercial; boa adaptação às oscilações de qualidade água e boa disponibilidade de alevinos o ano todo (Araújo-Lima e Gomes, 2005, Chagas et al., 2012). Aliado a isso, o fornecimento do tambaqui é proporcional à necessidade da população da região Norte, que tem o pescado como sua principal fonte de proteína animal, com consumo *per capita* estimado em 30 kg/hab/ano (FAO, 2016), ultrapassando a média de consumo mundial de 19,7 kg em 2013.

Embora as tecnologias de reprodução e os conhecimentos sobre a criação da espécie sejam bem difundidos, a intensificação da produção do tambaqui tem sido acompanhada de sistemas de produção com altas taxas de adensamento, excesso de manipulação nos viveiros, práticas inadequadas de manejo, resultando em problemas com a qualidade de água, entre outros fatores, que podem culminar na imunossupressão dos animais e favorecer o aparecimento de doenças nos peixes (XU et al., 2012; QUESADA et al., 2013). Ilustrando esse fato, o anuário de produção aquícola da PeixeBR (2019), relata que houve uma queda de 4,7% da produção de tambaqui no ano de 2018 com relação ao ano anterior, isso se deve, além das práticas de manejo inadequadas, ao aparecimento de doenças parasitárias graves em pisciculturas, em especial a acantocéfaloze (Chagas et al., 2018)

### 1.1.3 Filo Acanthocephala

Atualmente, parasitos do filo Acanthocephala tem se demonstrado como limitador na produção de tambaqui na região Norte. Este filo é monofilético, em que as espécies são exclusivamente parasitas, sem nenhuma fase de vida livre (Kennedy et al., 2006), e somente três gêneros são encontrados em peixes de água doce no Brasil: *Echinorhynchus*, *Neoechinorhynchus* e *Polyacanthorhynchus* parasitando, respectivamente, matrinxã amazônico *Brycon amazonicus* e pirapitinga *Piaractus pbrachypomus* (OLIVEIRA et al., 2019); tambaqui (MATOS et al., 2017; JERÔNIMO et al., 2017; ALVES et al., 2019) e pirarucu (MARINHO et al., 2013). Estes parasitos possuem como característica principal uma probóscide retrátil provida de espinhos que é utilizada como mecanismo de fixação, cujo

movimento de invaginação se dá a partir da pressão hidráulica proveniente da contração da musculatura do saco da probóscide, o que está diretamente relacionado com o sistema nervoso do parasito (NUÑEZ e DRAGO, 2017).

A ação mecânica da probóscide na parede intestinal dos hospedeiros induz alterações na estrutura e na função do órgão (SANIL et al., 2011). O grau de dano causado pelos acantocéfalos a seus hospedeiros e a intensidade das reações do hospedeiro dependem da profundidade da penetração do parasito nos tecidos do intestino e da densidade das cargas parasitárias (TARASCHEWSKI, 2000). Geralmente, os danos causados pela introdução da probóscide são a hiperplasia e hipertrofia de células caliciformes intestinais (MARTINS et al., 2001; DEZFULI et al., 2009), granuloma, dilaceração do tecido do intestino, diminuição da área de absorção (vilos), edemas e uma intensa resposta inflamatória com migração de células fagocíticas (JERÔNIMO et al., 2017; AGUIAR et al., 2018). Amin et al. (2013), relataram que a penetração dos ganchos da probóscide de *Leptorhynchoides polycristatus* causou a compressão de vilos intestinais e necrose do epitélio em esturjões *Acipenser* spp., além de causar hemorragia e migração de granulócitos.

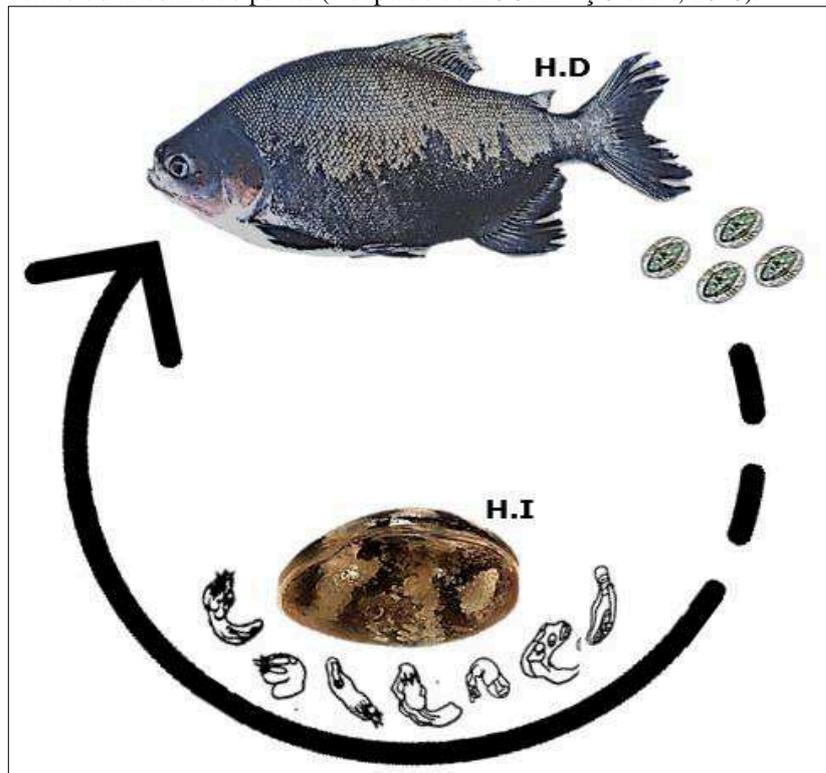
#### 1.1.3.1 *Neoechinorhynchus buttnerae* (Golvan, 1956)

O primeiro registro de *N. buttnerae* em pisciculturas foi realizado por Malta et al. (2001), na fase de recria de tambaqui, no município de Itacoatiara no Amazonas. Alguns anos depois, também no interior do Amazonas, um novo relato de mortalidade massiva pelo acantocéfalo foi feito por Maciel et al. (2008) na fase de larvicultura. Adicionalmente Aquino-Pereira et al. (2014) também relataram surto dessa parasitose em pisciculturas do Rio Preto da Eva, AM, seguido por Matos et al. (2017), Gomes et al. (2017) e Chagas et al. (2019), estes últimos relatando quase 13.000 helmintos em somente 37 tambaquis coletados no município.

Os peixes infectados pelo parasito não apresentam sinais clínicos dificultando o diagnóstico da doença que só é realizado em casos de alta mortalidade (MALTA et al., 2001). Os parasitos competem pelos nutrientes com os hospedeiros e podem ocasionar perda de peso e caquexia seguida de morte, em casos mais severos (SANIL et al., 2011). Silva-Gomes et al. (2017), relataram que o parasitismo por *N. buttnerae* com intensidade média de entre 103,25 e 152,5 foi responsável por um declínio de 200% no crescimento de tambaquis. Os mesmos autores também relataram diminuição no fator de condição de peixes parasitados pelo acantocéfalo comprovando que, embora sem sinais clínicos, a doença afeta diretamente o desenvolvimento do peixe e conseqüentemente a rentabilidade da produção.

O ciclo de vida dos acantocéfalos é indireto ou heteroxeno, e requer a presença de um hospedeiro definitivo vertebrado e um artrópode como hospedeiro intermediário. O *N. buttnerae* utiliza o tambaqui como único hospedeiro definitivo e o ostracoda *Cypridopsis vidua* como intermediário (LOURENÇO et al., 2018). O hospedeiro intermediário se alimenta dos ovos liberados nas fezes dos peixes que eclodem em seu trato digestório. A larva acântor presente no ovo, armada com os primórdios da probóscide, penetra no intestino do hospedeiro intermediário e se desenvolve em vários estágios ontogenéticos até alcançar a fase de acantela, onde todos os órgãos reprodutores já estão formados (WARD, 1940). Ao final do desenvolvimento da acantela, no 26º dia após a ingestão de ovos, o parasito alcança sua última fase imatura, o cistacanto, que consiste no estágio infectante para o hospedeiro definitivo e se caracteriza pela formação de cistos infecciosos de quitina que completarão seu desenvolvimento dentro do intestino do peixe e recomeçarão o ciclo (LOURENÇO et al., 2018) (Figura 1).

**Figura 1** - Ciclo de vida do *Neoechinorhynchus buttnerae*. As fezes dos peixes contendo os ovos do parasito são liberadas no meio ambiente e posteriormente ingeridos pelo hospedeiro intermediário ostracoda (*Cypridopsis vidua*). A larva acântor contida dentro do ovo, eclode no lúmen intestinal do hospedeiro intermediário (HI), onde se fixa e passa por sucessivos estágios ontogênicos até alcançar a fase infectante ao hospedeiro definitivo (HD), cistacanto, que por sua vez segue seu desenvolvimento dentro do intestino do peixe. (Adaptado de LOURENÇO et al., 2018).



A alta disponibilidade dos hospedeiros intermediários dentro de viveiros escavados é um dos maiores obstáculos para o controle da acantocéfalose, uma vez que a presença de matéria orgânica e as condições de cultivo aumentam o sucesso de sobrevivência destes microcrustáceos, cuja reprodução gera cistos de resistência que podem sobreviver por meses, ou até décadas, mesmo em solo seco e voltar a eclodir em condições adequadas como a reidratação e a presença de luz (HORNE et al., 2002).

#### 1.1.4 Tratamentos convencionais para parasitos helmintos em peixes

As infecções por acantocéfalo vêm causando altas perdas econômicas aos piscicultores e ainda não existe medicamento liberado para o tratamento dessa doença no Brasil. Tavares-Dias e Martins (2017) afirmaram que a acantocéfalose é responsável pela mortalidade de pelo menos 1,12 toneladas de peixes por ano, causando um prejuízo de aproximadamente 2 milhões de dólares. Assim, diante da necessidade de sanar os problemas sanitários, os piscicultores fazem a utilização maciça de antibióticos, desinfetantes e pesticidas, substâncias químicas de rápido efeito, porém com alta toxicidade para os peixes, seres humanos e ambiente. (TAVARES-DIAS et al., 2004).

Para o controle destes parasitos muitos produtos químicos são utilizados, por exemplo, as avermectinas, levamisol (OLIVEIRA, 2019; HIRAZAWA et al., 2000) e os benzimidazóis (MARTINS et al., 2001) utilizados como endoparasiticidas além de outros químicos, que em sua maioria podem ser tóxicos para os peixes, comprometendo principalmente as brânquias, o tegumento e o fígado (TAVARES-DIAS et al., 2011; GOVIND et al., 2012b).

Em estudo, Alves et al. (2019) relatou que concentrações *in vitro* de levamisol (50-125 mg L<sup>-1</sup>), albendazol (500 a 2.000 mg L<sup>-1</sup>) e ivermectina (200 a 350 mg L<sup>-1</sup>) foram 100% eficazes contra *Anacanthorus spatulatus*, *Notozothecium janauachensis*, *Mymarothecium boegeri* e *Linguadactyloides brinkmanni*, parasitos monogenoides de tambaqui. Em pacu *Piaractus mesopotamicus*, Martins et al. (2001) verificaram que banhos de mebendazol, nas concentrações de 100 mg L<sup>-1</sup> (10 minutos) e 10 mg L<sup>-1</sup> (24 h), apresentaram eficácia de 79,6 e 81,4%, respectivamente, também contra monogenoides.

Contra o acantocéfalo *N. buttnerae*, Oliveira et al. (2019) relataram 100% de eficácia com o benzoato de emamectina a 100 mg L<sup>-1</sup>; levamisol a 300 mg L<sup>-1</sup>; ivermectina a 4.500 mg.L<sup>-1</sup> e praziquantel a 2.500 mg L<sup>-1</sup>, mas não encontraram eficácia com a utilização de loperamida para este parasito. Por outro lado, relatos de Taraschewski (1990) comprovaram a

eficácia da loperamida (50 mg Kg<sup>-1</sup>) contra *Neoechinorhynchus rutili* e *Eoechinorhynchus truttae* de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*. Os mesmos autores também observaram eficácia do praziquantel para o *N. rutili*. Em um outro estudo, Lal et al (1947) encontraram 100% de eficácia contra *E. truttae* ao utilizar de tetracloreto de carbono em truta marrom *Salmon trutta* a 0,1 e 0,05%. Adicionalmente, Feitoza-Silva et al (2019) observaram eficácia de 41% contra *N. buttnerae*, com 15 dias de suplementação alimentar com 100 mg mL<sup>-1</sup> de levamisol para tambaquis.

Embora haja rápida eficácia, a viabilidade da utilização contínua destes químicos deve ser considerada por conta de seus efeitos tóxico e bioacumulativo em peixes que chegarão ao consumidor humano, além da possibilidade de causarem resistência em organismos não-alvo, culminando em um desequilíbrio ambiental. Diante desta problemática envolvendo saúde pública, a procura por tratamentos alternativos e igualmente eficazes vem aumentando e, por isso, estudos com extratos vegetais que possuem compostos bioativos, como os óleos essenciais, vêm sendo amplamente realizados.

### **1.1.5 Óleos essenciais e seu emprego na aquicultura**

Os óleos essenciais são compostos derivados do metabolismo secundário das plantas, cuja função é proteger contra patógenos, herbivoria e atrair insetos polinizadores (BAKKALI et al., 2008; GITHIORI et al., 2006). São substâncias complexas e altamente odoríferas, que podem ser formadas por 20-60 componentes fitoquímicos distintos onde somente 2 ou 3 estão presentes em altas concentrações, sendo estes considerados compostos majoritários responsáveis pela ação biológica dos óleos (Peixoto et al., 2015).

Quando comparados aos quimioterápicos, os óleos essenciais se sobressaem por serem ambientalmente amigáveis em sua utilização, com potencial biodegradável, diminuição dos resíduos nos animais, menor potencial tóxico por serem menos concentrados em relação ao princípio ativo, possuem diversos mecanismos de ação, grande variedade de componentes químicos presentes em sua composição o que dificulta ou impossibilita o surgimento de organismos resistentes, além do fato de ser uma alternativa mais barata e efetiva (SOARES e TAVARES-DIAS, 2013; SOARES et al., 2016; REVERTER et al., 2014).

O maior obstáculo para a produção em larga escala de óleos essenciais para controle de doenças, é que muitos fatores podem influenciar na composição e rendimento dos óleos essenciais, como clima, temperatura, composição do solo, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica a que a planta está submetida, além de

ataque de patógenos, idade da planta, horário de coleta e órgão utilizado (ANDRÉ et al., 2018). Portanto, a análise química destes extratos é fundamental, pois as concentrações dos constituintes podem variar consideravelmente para uma mesma espécie (FARIAS-JUNIOR et al., 2012; MORAIS et al., 2009).

Ainda assim, estudos testando a eficácia dessas substâncias e de seus componentes majoritários isolados demonstraram efeito positivo tanto no controle de helmintoses em peixes (HASHIMOTO et al., 2016; SOARES et al., 2013), quanto de bacterioses (MAJOLO et al., 2018; VALLADÃO et al., 2019) e infecções por protozoários (TAVECHIO et al., 2009; VALLADÃO et al., 2016), além de propriedades imunomoduladoras (VALLADÃO et al., 2019) que são responsáveis pela ativação de defesas imunológicas específicas e inespecíficas nos peixes, resultando em proteção precoce contra infecções (CHAKRABORTY e HANCZ, 2011).

Segundo Bakkali et al. (2008), a forma de ação dos óleos essenciais se dá quando interagem com a membrana citoplasmática dos parasitos helmintos, podendo causar ruptura da estrutura de polissacarídeos, lipídeos e fosfolipídios, promovendo despolarização da membrana, como as das mitocôndrias, resultando na liberação de íons de cálcio e proteínas. Em complemento, Bruni et al. (2004) relataram que ação nematicida dos óleos essenciais pode ser atribuída à presença de fenóis, aldeídos e álcoois que causam a oxidação de membranas dos parasitos.

#### 1.1.5.1 Óleos essenciais de *Lippia* spp. (Verbenaceae)

O gênero *Lippia* pertence à família Verbenaceae possui cerca de 175 gêneros e 2800 espécies, é difundido nos trópicos e subtropicais nas regiões temperadas do Hemisfério Sul e poucas espécies no Hemisfério Norte (Barroso, 1991). No Brasil, ocorrem principalmente *Lippia gracilis* (Figura 2A), *Lippia sidoides* (Figura 2B), *Lippia alba* (Figura 2C), *Lippia grandis*, *Lippia origanoides*, e *Lippia triplinervis*.

Na aquicultura, os óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* tem demonstrado efeitos positivos no controle de diversas parasitoses. Em estudo, Soares et al. (2016), utilizando o OE de *Lippia origanoides*, relatam que as concentrações de 320 e 160 mg L<sup>-1</sup> durante 30 e 60 min de exposição foram 100% eficazes contra monogenoídeos de tambaqui em teste *in vitro*. Similarmente, Hashimoto et al. (2016) relatam efeito anti-helmíntico do OE de *Lippia sidoides* contra diversas espécies de monogenoídeos de brânquias de tilápia-do-nilo.

Há eficácia dos óleos essenciais de *Lippia* spp. também contra bacterioses em aquicultura como relatado por Majolo et al. (2018) que verificaram que a maior atividade antibactericida em *Streptococcus agalactiae* foi do óleo de *L. sidoides* (MIC: 312.5  $\mu\text{L}^{-1}$  mg.L<sup>-1</sup>). Sutili et al. (2015) e Majolo et al (2016) também descreveram o efeito bactericida e bacteriostático do óleo essencial de *Lippia alba* sobre algumas bactérias gram-negativas, como *Aeromonas hydrophila*. Além disso, em tilápia-do-nilo demonstrou-se que o óleo essencial de *L. organoides* e seu constituinte majoritário (carvacrol) apresentaram atividade, principalmente, contra bactérias intestinais, tais como *Escherichia* sp., *Salmonella* sp., *Edwardsiella* sp. *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp. e *Klebsiella* sp. (LA ROSA, 2011).

**Figura 2** - A-*Lippia gracilis*, B-*Lippia sidoides* e C-*Lippia alba* (Verbenaceae).



Fonte: <http://twixar.me/Kmvn>

Existem também relatos positivos sobre o uso de óleos de *Lippia* como moduladores de estresse em peixes (SENA et al., 2016; AZAMBUJA et al., 2011), e promotores de crescimento e anestésico (CUNHA et al, 2010; BATISTA et al., 2018). Comprovando que os estudos conduzidos durante duas décadas têm demonstrado grande potencial de *Lippia* spp. na medicina veterinária, devido aos diferentes constituintes bioativos com múltiplas propriedades destas plantas. Entretanto, há a necessidade aprofundar os estudos farmacológicos para possibilitar a implementação de protocolos de tratamento de enfermidades em aquicultura que sejam potencialmente eficazes e não agridam o meio ambiente.

### 1.1.6 Atividade ovicida dos óleos essenciais

É possível avaliar o potencial helminticida de diversos compostos em diferentes estágios dos parasitos como ovos, larvas e adultos ou em diferentes componentes do seu ciclo de vida. Em trabalho realizado por Nery et al. (2010), o extrato aquoso de folhas de *Anacardium humile* demonstrou inibição de 90,9% na eclosão dos ovos do nematoide de ovelha em concentração de 100 mg mL<sup>-1</sup>. Similarmente, ao utilizarem o extrato hidroalcoólico de *Artemisia annua*, Sprenger et al. (2016) relataram 90% de inibição da eclodibilidade de ovos de *H. contortus* em concentrações de 25 e 50 mg mL<sup>-1</sup>. Já Macedo et al. (2009), ao utilizarem o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* na concentração de 43,5 mg mL<sup>-1</sup>, relataram 98,7% de inibição do desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus*.

Com relação ao acantocéfalo, todos os escassos relatos disponíveis na literatura foram realizados somente com as formas adultas do parasito. Entretanto, o estágio inicial, embora não possua fase de vida livre, é a forma que está em maior quantidade dentro do viveiro, uma vez que cada fêmea pode ovipôr mais de 800 ovos por ciclo reprodutivo, de acordo com contagem subjetiva realizada neste trabalho. A redução da disponibilidade de ovos de acantocéfalo do ambiente seria uma das formas viáveis de controlar o crescimento desenfreado da população desses parasitos, resultando na redução da carga parasitária. Portanto, este estudo objetivou avaliar o efeito ovicida de três óleos de *Lippia* sp em *Neoechinorhynchus buttnerae*, além de elucidar aspectos morfológicos dos ovos destes parasitos, sobre os quais ainda não há estudos publicados.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Geral

Descrever morfológicamente os ovos do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* e avaliar o efeito dos óleos essenciais de *Lippia alba*, *Lippia gracilis* e *Lippia sidoides* sobre eles.

### 1.2.2 Específicos

Descrever as estruturas envoltórias do ovo de *Neoechinorhynchus buttnerae*;

Avaliar diferentes concentrações do óleo essencial de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracilis* na inviabilização, eclosão e integridade da membrana dos ovos de *N. buttnerae*.

## 2 CAPÍTULO 1

**Atividade ovicida dos óleos essenciais de *Lippia alba*, *Lippia sidoides* e *Lippia gracilis*  
sobre o acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*  
(Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae)**

Artigo redigido nas normas da *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*

## ABSTRACT

Tambaqui (*Colossoma macropomum*) production has been limited due to acanthocephalosis and the need for strategies to control the parasitosis. This study aimed to elucidate the morphological characteristics of the eggs of the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* and to evaluate the ovicidal effect of the essential oils of *Lippia alba*, *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* on these structures. After dissection of adult tambaquis naturally infected with *N. buttnerae*, the eggs of the parasite were collected directly from the females and distributed into 12-well plates containing the essential oils in the following dilutions: 0.5; 1; 2; 5 and 10 mg mL<sup>-1</sup>, plus a control containing water + Tween<sup>®</sup> 3%, as a diluent medium of the oils. Part of the eggs (n=300) were separated and measured (length and width) with the aid of the optical microscope coupled to a digital program. The viability of the treated eggs was monitored 24 h after treatment and the eggs were classified as viable, unviable and hatched. The oil of *L. sidoides* 2 mg mL<sup>-1</sup> caused 100% of the eggs to be impaired. The oil of *L. gracilis* only had ovicidal effect from 5 mg mL<sup>-1</sup> and *L. alba* did not cause significant mortality in eggs. *L. alba* caused the greatest hatching of acanthors.

**Keywords:** Fish farm, tambaqui, acanthocephalan, phytotherapeutic, treatment.

## RESUMO

A produção de tambaqui (*Colossoma macropomum*) tem sofrido limitações devido a acantocefalose e, por isso, há a necessidade de formular estratégias para controlar a parasitose. Por isso, este estudo objetivou elucidar características morfológicas dos ovos do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* e avaliar o efeito ovicida dos óleos essenciais de *Lippia alba*, *Lippia sidoides* e *Lippia gracilis* sobre estas estruturas. Após a dissecação de tambaquis adultos naturalmente infectados por *N. buttnerae*, os ovos do parasito foram retirados diretamente das fêmeas e distribuídos em placas de 12 poços contendo os óleos essenciais nas seguintes diluições: 0,5; 1; 2; 5 e 10 mg mL<sup>-1</sup>, além de um controle contendo água + Tween<sup>®</sup> 3%, como meio diluente dos óleos. Parte dos ovos (n=300) foram separados e medidos (comprimento e largura) com o auxílio do microscópio óptico acoplado a um programa digital. A viabilidade dos ovos tratados foi acompanhada 24 h após o tratamento e os ovos foram classificados em viáveis, inviáveis e eclodidos. O óleo de *L. sidoides* 2 mg mL<sup>-1</sup> inviabilizou 100% dos ovos, sendo que o óleo de *L. gracilis* somente apresentou efeito ovicida a partir de 5 mg mL<sup>-1</sup> e o de *L. alba* não provocou mortalidade significativa nos ovos. *L. alba* provocou a maior eclosão de acântores.

**Palavras-chave:** Piscicultura, tambaqui, acantocéfalo, fitoterápico, tratamento.

## 2.1 INTRODUÇÃO

O acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* pertencente à família Neoechinorhynchidae, é um helminto intestinal específico do tambaqui (*Colossoma macropomum*), e tem sido responsável por perdas econômicas no cultivo desta espécie (TAVARES DIAS e MARTINS, 2017). Este parasito possui como característica principal a probóscide, estrutura provida de espinhos que, ao fixar-se na parede intestinal pode causar injúrias severas como dilacerações teciduais no intestino, metaplasia e perda de vilos intestinais (JERÔNIMO et al., 2017). Devido à ausência do sistema digestório, os acantocéfalos se alimentam por difusão, através de poros presentes na parede do corpo, absorvendo açúcares, nucleotídeos, aminoácidos e triglicerídeos do intestino do hospedeiro (NUÑEZ e DRAGO, 2017), competindo por nutrientes e podendo levar a caquexia e até morte nos peixes em casos mais severos (MALTA et. al., 2001; JERÔNIMO et al., 2017).

O acantocéfalo *N. buttnerae* utiliza o tambaqui como único hospedeiro definitivo e o ostracoda *Cypridopsis vidua* como hospedeiro intermediário (LOURENÇO et al., 2017) que se alimenta dos ovos liberados nas fezes dos peixes parasitados. A larva acântor presente no ovo, armada com os primórdios da probóscide penetra no intestino do hospedeiro intermediário e se desenvolve por vários estágios ontogenéticos até alcançar a fase de acantela, onde todos os órgãos reprodutores já estão formados (WARD, 1940). Ao final do desenvolvimento da acantela, o parasito alcança sua última fase imatura, o cistacanto, que consiste no estágio infectante para o hospedeiro definitivo e se caracteriza pela formação de cistos infecciosos de quitina que completarão seu desenvolvimento dentro do intestino do peixe e recomearão todo o ciclo (LOURENÇO et al., 2017).

Uma das formas de controle viável da doença seria a diminuição da disponibilidade de ovos do acantocéfalo no ambiente de cultivo, afim de interromper o ciclo de vida do parasito e amenizar as perdas econômicas causadas pela acantocefalose (TAVARES-DIAS e MARTINS, 2018). Os testes de inibição de eclosão de ovos são muito utilizados pois indicam o potencial que uma substância possui para penetrar nas membranas de proteção do embrião e assim interromper seu desenvolvimento (ANDRÉS et al., 2012). Em nematoides, esses testes são utilizados para avaliar o potencial anti-helmíntico das substâncias através de testes de eclosão de ovos, de motilidade e de migração larvar (ZHU et al., 2013; MACEDO et al., 2009).

Os relatos de controle de fases iniciais de acantocéfalo ainda são inexistentes, havendo discretos estudos abordando a eficácia de quimioterápicos (levamisol, praziquantel,

ivermectinas e benzimidazóis) no controle de formas adultas do parasito (TARASCHEWSKI et al., 1990; OLIVEIRA et al., 2019; MORAES et al., 2019). Porém, o uso indiscriminado destas substâncias pode acarretar seleção de organismos resistentes; riscos aos manipuladores; contaminação dos os efluentes onde são despejados, geralmente em corpos de água naturais, além do acúmulo residual na carne dos pescados cultivados. Por isso, substâncias fitoterápicas também têm sido bastante exploradas como uma alternativa no tratamento do *N. buttnerae*, e vêm se mostrando potencialmente eficazes contra este parasito (SALARO et al., 2017; SEIXAS et al., 2019; COSTA et al., 2018).

Fitoterápicos como os óleos essenciais (OEs), são misturas complexas de substâncias voláteis e lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odorífera e líquida (MILLEZI, 2014) possuindo ampla variação de componentes químicos bioativos como terpenos e flavonóides, que são responsáveis por interferir nas funções bioquímicas e fisiológicas dos parasitos (KAPLAN et al., 2014; NORDI et al., 2014). Os OEs são biodegradáveis e devido a variedade de componentes químicos são menos propensos a causar bioacumulação e o surgimento de organismos resistentes (KULKARNI et al., 2013), apresentando-se como uma forma de controle alternativo em potencial para doenças de peixe como observado por Hashimoto et al. (2016) e Soares et al (2017).

É importante elucidar que estratégias para o controle da disseminação do parasito em fases iniciais devem ser desenvolvidas, afim de inviabilizar do sucesso do ciclo de vida do parasito e, considerando que o ambiente é vulnerável a diversos produtos sintéticos e químicos, a utilização de produtos naturais para o controle de parasitoses parece ser mais adequada para esta finalidade. Diante disto, este estudo objetivou elucidar características morfológicas dos ovos e *N. buttnerae*, além de avaliar o uso de óleos essenciais de plantas *Lippia* spp. na inviabilização destes ovos, a fim de embasar estudos posteriores para controle desta fase do parasito, que certamente não deve ser desconsiderada.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Extração e caracterização dos óleos essenciais de *Lippia alba*, *Lippia sidoides* e *Lippia gracilis*

Os óleos essenciais utilizados neste estudo foram obtidos pelo processo de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger. De cada planta, uma amostra de 500 g de folhas ou rizoma foi colocada em um balão volumétrico de 12.000 mL, acoplado a uma manta aquecedora e completado com água destilada, até a imersão total do material. O processo de

extração durou 4 h e, após isso, os óleos essenciais foram estocados em freezer 4°C para as análises posteriores.

Os componentes químicos dos OEs de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracilis* foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás 7890A da Agilent (Palo Alto, EUA) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida com 5% de fenila/95% de metil silicone (HP5, 30 m × 0,25 mm x 0,25 mm). Os óleos foram diluídos a 1% em diclorometano e 1,0 mL desta solução foi injetada em modo split (1:100). O injetor foi mantido a 250°C, o detector de ionização de chama (FID) a 280°C e o hidrogênio foi usado como gás carreador.

Os espectros de massa foram obtidos em um sistema Agilent 5973N MSD operando em modo de ionização eletrônica a 70 eV, com faixa de varredura de massa de 40-500 m z<sup>-1</sup>. A taxa de amostragem foi de 3,15 scans s<sup>-1</sup> e o gás Hélio foi usado como carreador. Os componentes do óleo foram identificados por uma pesquisa usando a 6ª edição do Registro Wiley de Dados Espectrais de Massa.

### 2.2.2 Hospedeiros e parasitos

Juvenis de tambaqui naturalmente parasitados por *N. buttnerae* foram adquiridos de uma piscicultura localizada no município Rio Preto da Eva (2° 41' 56" S, 59° 42' 0"W), na região metropolitana de Manaus. Os peixes eram mantidos em caixas d'água de polietileno de 1000 L, com aeração e aquecedores constantes e foram alimentados duas vezes ao dia até saciedade aparente, com ração comercial de 28% de proteína bruta.

Para obtenção dos parasitos, os peixes foram eutanasiados (Comissão de Ética no Uso de Animais/UNINILTON 001/2017). Os peixes foram colocados em baldes de água contendo 75 mg L<sup>-1</sup> de eugenol até que cessassem os batimentos cardíacos e, após isso, eutanasiados por secção da coluna vertebral para posterior dissecação.

Os parasitos foram retirados do lúmen intestinal dos peixes com a ajuda de uma pinça e eram imediatamente colocados em placas de Petri contendo solução salina a 0,9%. As fêmeas de acantocéfalo foram separadas considerando suas características morfológicas, como o formato da sessão posterior do corpo e maior tamanho em relação aos machos, e seus ovos obtidos por uma pequena ruptura feita na sessão posterior do parasito, por onde eram liberados. Utilizou-se um *pool* de ovos de 10 fêmeas para cada teste realizado. Os ovos íntegros foram caracterizados pela total integridade da membrana ao serem expostos ao corante (eosina básica) (Fig. 5), ao passo que os ovos inviáveis (mortos) foram identificados

quando o corante adentrou toda a parte interna do ovo. Os acântores eclodidos foram diferenciados pelo formato cilíndrico característico.

### 2.2.3 Delineamento experimental

Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  foram retiradas do pool de ovos e distribuídas nas unidades experimentais. As unidades experimentais consistiam em: um grupo controle (Tween<sup>®</sup> 3%, o meio diluente dos óleos essenciais) e quatro tratamentos (Tween<sup>®</sup> 3% + OE nas concentrações de 0,5, 1, 2, 5 e 10  $\text{mg L}^{-1}$ ) contendo OE de *L. alba*, *L. sidoides* e *L. gracilis* em triplicata. Após a distribuição dos ovos nas placas de 12 poços (volume total de 1 mL), os mesmos eram mantidos em estufa à 28°C, seguindo a recomendação de Costa et al. (2018) e avaliados após 24 h.

Para a avaliação da viabilidade dos ovos, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  foi corada com 2  $\mu\text{L}$  de eosina e a integridade da membrana era visualizada quanto a penetração do corante na membrana externa, identificando a ruptura ou não do envoltório do ovo, caracterizando a inviabilidade da estrutura. Para cada tratamento, o número de ovos integros, eclodidos e mortos foi registrado a cada 24 h. A medição dos ovos comprimento/largura e as fotografias foram realizadas em microscópio de luz Leica DM500 com a câmera Leica ICC50.

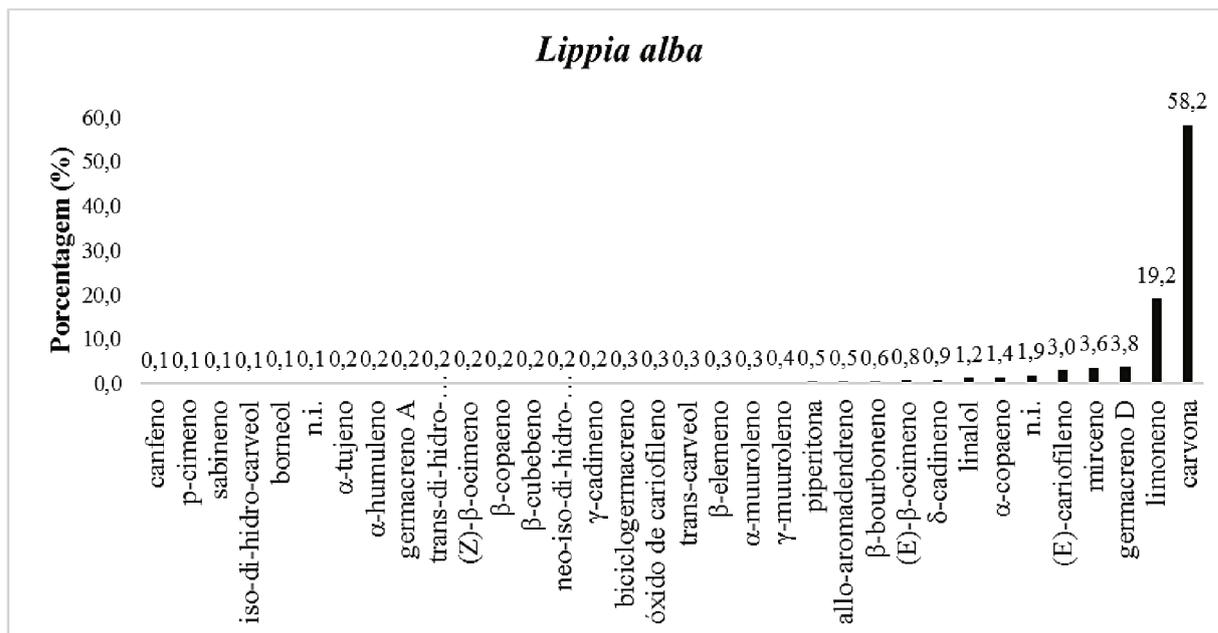
### 2.2.4 Análise estatística

De posse dos dados, estes foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e Levene para verificar a normalidade e homocedasticidade de variâncias e, após as premissas garantidas, realizou-se ANOVA unifatorial. Além disso, foi realizada uma análise de regressão polinomial, utilizada para correlacionar as concentrações dos óleos testadas com a inviabilização dos ovos do *N. buttnerae*. Todos os dados foram analisados ao nível de significância de 5% no programa estatístico GraphPad Prism 6.0.

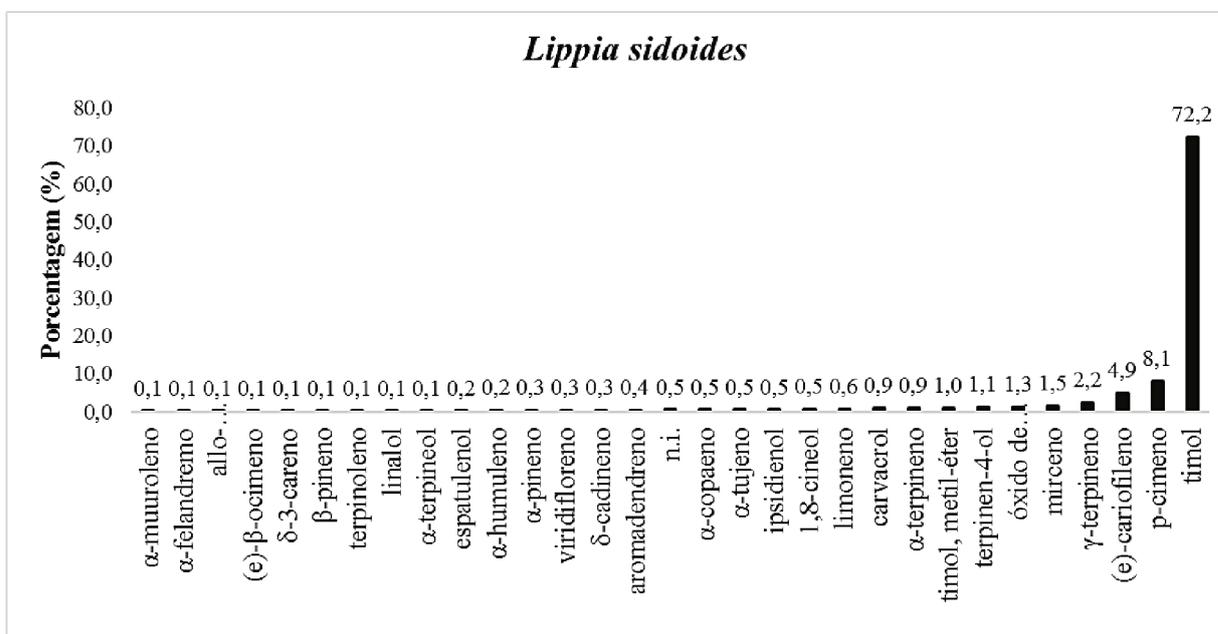
## 2.3 RESULTADOS

A análise química dos óleos apontou a carvona e o limoneno (58,2% e 19,2%, respectivamente) como componentes majoritários do OE de *L. alba* (Figura 1), ao passo que *L. sidoides* apresentou o timol como seu principal composto bioativo, ocupando 72% da

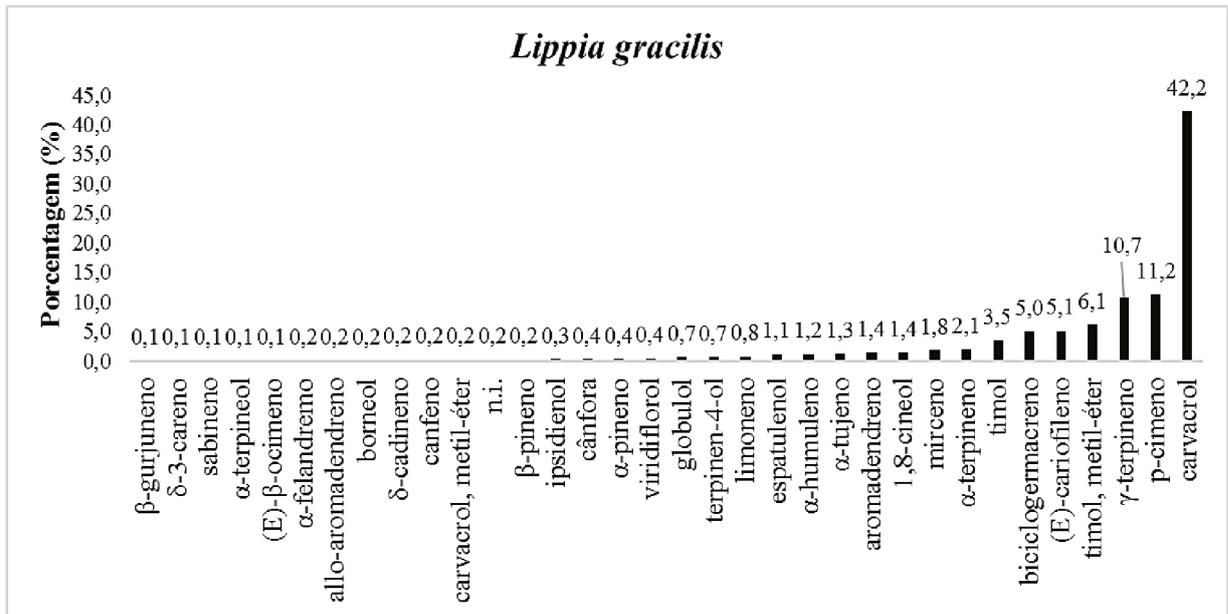
composição do óleo (Figura 2), e a *L. gracilis* teve o carvacrol (42%) como o principal componente presente em sua estrutura química (Figura 3).



**Figura 1** - Composição química do óleo essencial de *Lippia alba* obtida por cromatografia acoplada à espectrometria de massa.



**Figura 2** - Composição química do óleo essencial de *Lippia sidoides* obtida por cromatografia acoplada à espectrometria de massa



**Figura 3** - Composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (A), *Lippia sidoides* (B) e *Lippia gracilis* (C) obtida por cromatografia acoplada a espectrometria de massas.

Uma contagem subjetiva da quantidade de ovos liberados pelas fêmeas foi realizada e de acordo com os resultados, a ovoposição do parasito ultrapassa 800 ovos por ciclo reprodutivo. O comprimento médio dos ovos de *N. buttnerae* foi de  $31,9 \pm 4,6 \mu\text{m}$  e  $21,08 \pm 4,3 \mu\text{m}$  de largura (Fig. 4). A larva acântor é recoberta por três envoltórios (Fig. 5) separados por interstícios formados por diversos compostos lipídicos que fazem a proteção da fase embrionária do parasito, sendo a primeira membrana mais espessa (Fig. 5A) e a segunda um pouco mais delgada (Fig. 5B), seguida pela terceira membrana (Fig. 5C), mais próxima da larva.

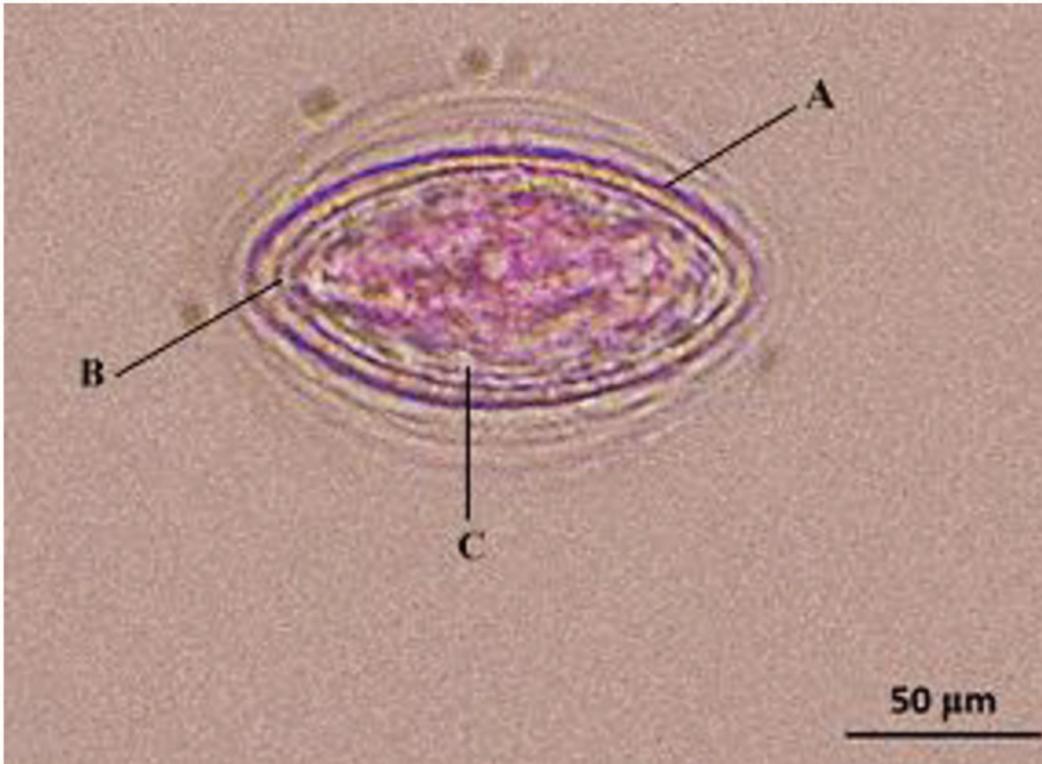
Os ovos de acantocéfalo possuíam três membranas aparentes. O envoltório embrionário externo de ovo é alongado e ligeiramente convergente no meio. O segundo envoltório ou membrana de fertilização (AMIN, 2002), e o terceiro, presente bem mais próximo da larva acântor são facilmente visíveis sob microscópio de luz (Fig. 5), havendo presença de estrias radiais entre eles. Foi possível observar a massa do endoblasto bem delimitada nos ovos visualizados.

Os ovos possuem formato elíptico ou oval, e são envolvidos por um envoltório externo de aspecto ligeiramente granular. Apresentam um revestimento fibrilar proeminente e fios fibrilares prologando-se sobre a superfície. No endoblasto, foi possível observar os macrômeros precedentes às futuras estruturas dos parasitos na extremidade anterior do ovo (Fig. 6A), ao passo que nos ovos considerados inviáveis era impossível visualizar qualquer

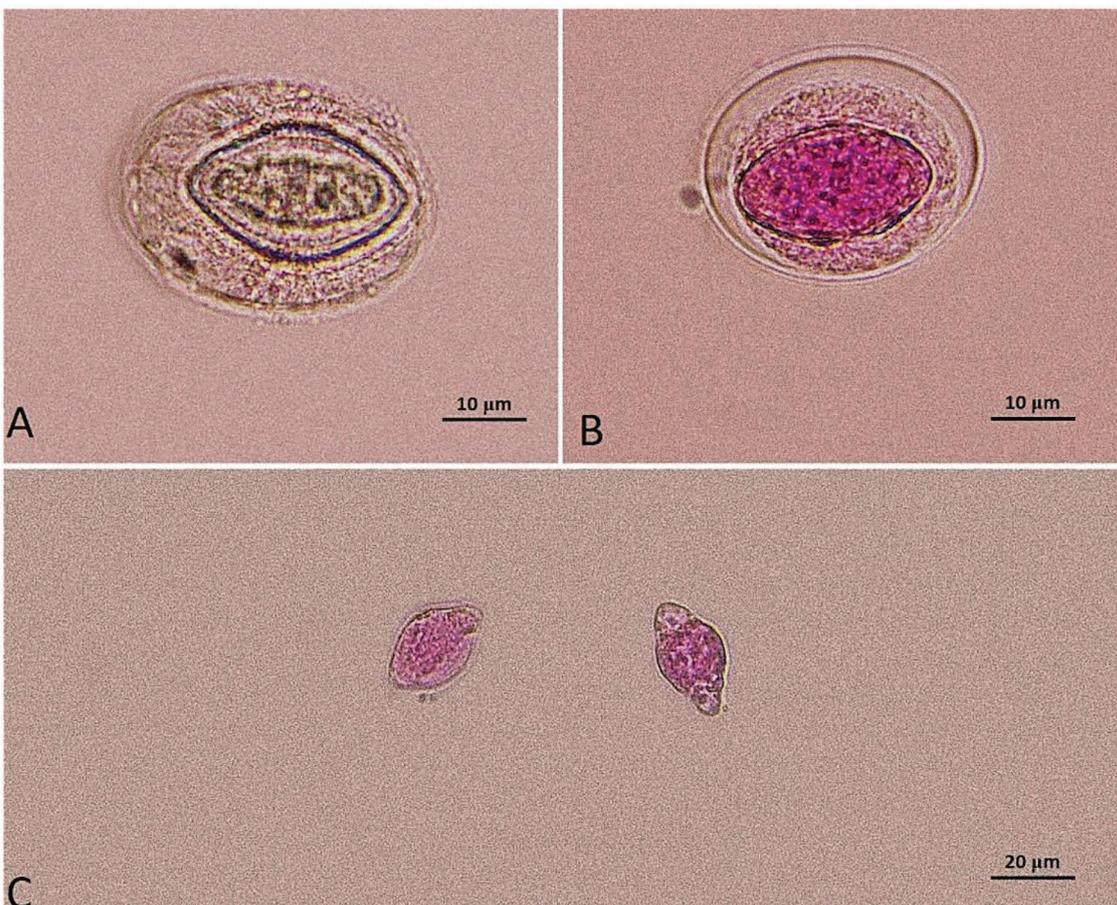
estrutura delimitada. (Fig. 6B). Os acântores eclodidos possuíam um formato fusiforme característico e por conta disso foram facilmente distinguidos (Fig. 6C).



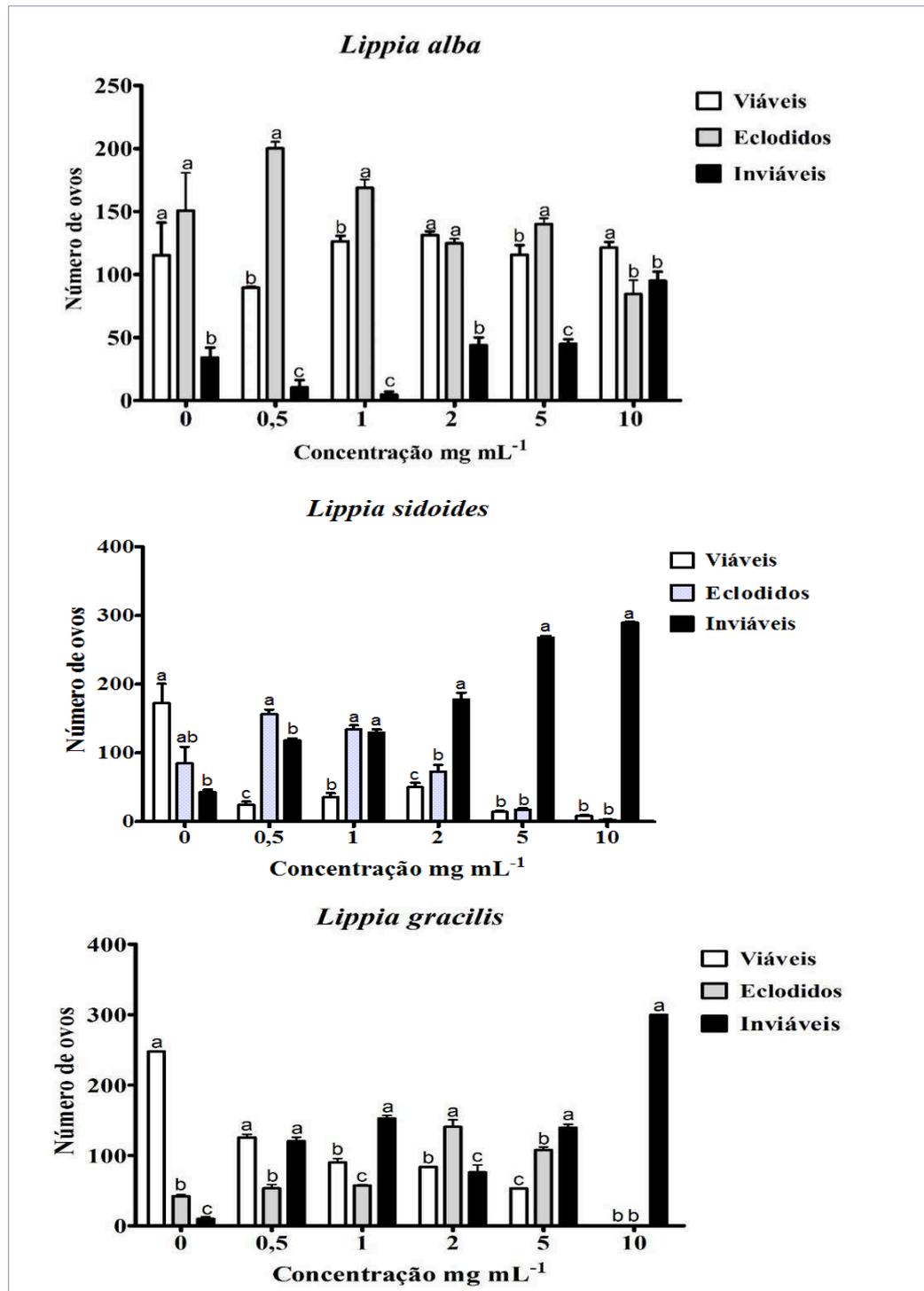
**Figura 4** - Ovos do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*.



**Figura 5** - Ovo de *Neoechinorhynchus buttnerae* contendo larva acântor com os três envoltórios delimitados. A: Membrana externa; B: Membrana de fertilização; C: Membrana interna.



**Figura 6** - Ovos de *Neoechinorhynchus buttnerae* corados com eosina básica. A: ovo viável; B: inviável; C: Acântores eclodidos.

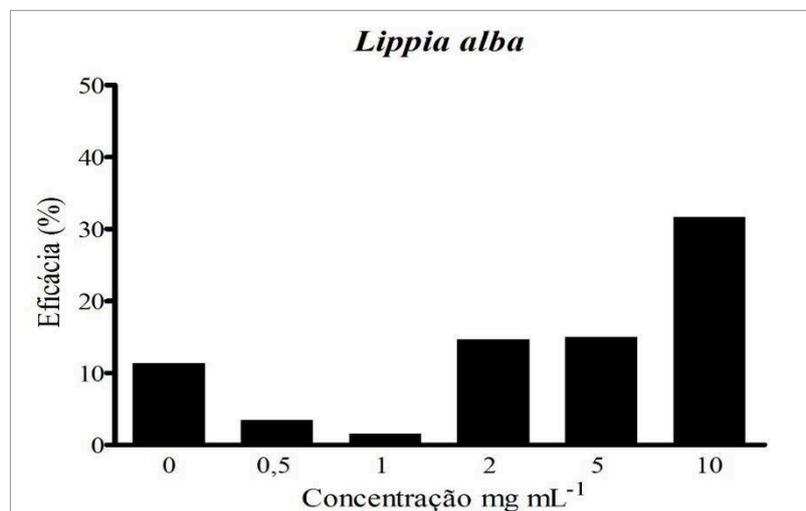


**Figura 7** - Efeito do óleo essencial de *Lippia gracilis* na integridade de membrana, eclosão e mortalidade de ovos de acantocéfalos. Letras diferentes representam diferença entre concentrações.

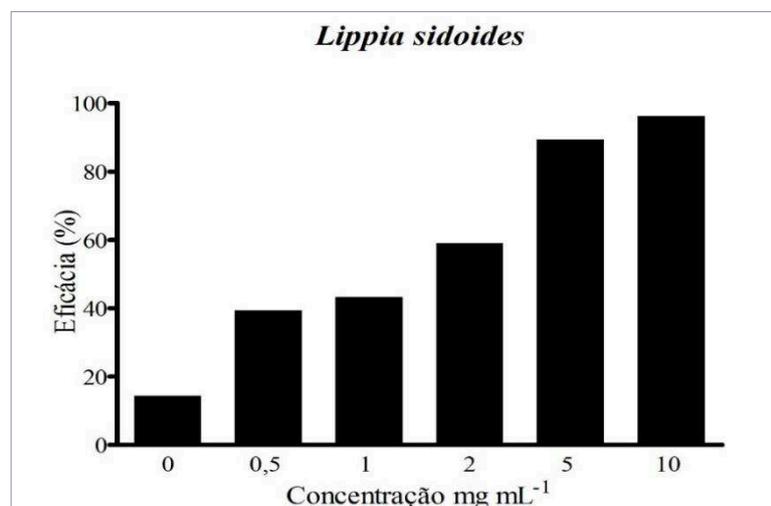
O tratamento com óleo essencial de *L. alba* (Fig. 7A) apresentou diferença entre todas as concentrações. As diluições utilizadas promoveram eclosão de ovos ( $P < 0,0001$ ) maior que ovos inviáveis, demonstrando que nenhuma das concentrações utilizadas foi suficiente para promover a mortalidade significativa dos ovos de *N. buttnerae*. A integridade de membrana permaneceu estável em todo o tratamento com este óleo essencial.

Quanto ao óleo de *L. sidoides* (Fig. 7B), em todas as concentrações utilizadas, a integridade de membrana dos ovos foi menor do que os ovos viáveis e houve uma maior eclosão de acântores na concentração de 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. Além disso, a partir da concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup>, a mortalidade dos ovos foi crescente, promovendo a inviabilização total dos ovos contabilizados.

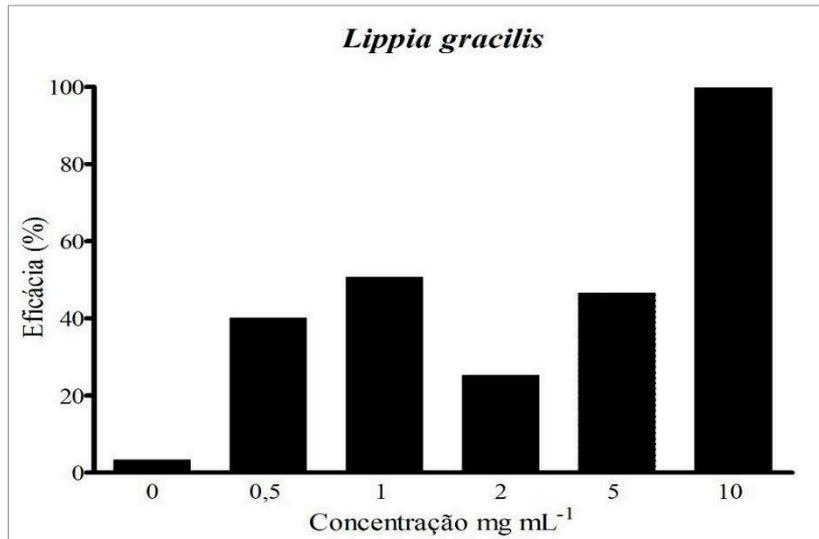
Com relação ao óleo essencial de *L. gracilis* (Fig. 7C) a inviabilização dos ovos se deu a partir de 1 mg mL<sup>-1</sup>, com exceção da concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup>, onde a mortalidade foi menor do que a eclosão de acântores. A quantidade de ovos com membrana íntegra foi estatisticamente igual aos ovos inviáveis na concentração de 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, e foi menor nas concentrações seguintes.



**Figura 8** - Efeito do óleo essencial de *Lippia gracilis* na integridade de membrana, eclosão e mortalidade de ovos de acantocéfalo. Letras diferentes representam diferença entre concentrações.



**Figura 9** - Eficácia (%) do óleo essencial de *Lippia sidoides* sobre a inviabilização dos ovos de *Neoechinorhynchus buttnerae*.



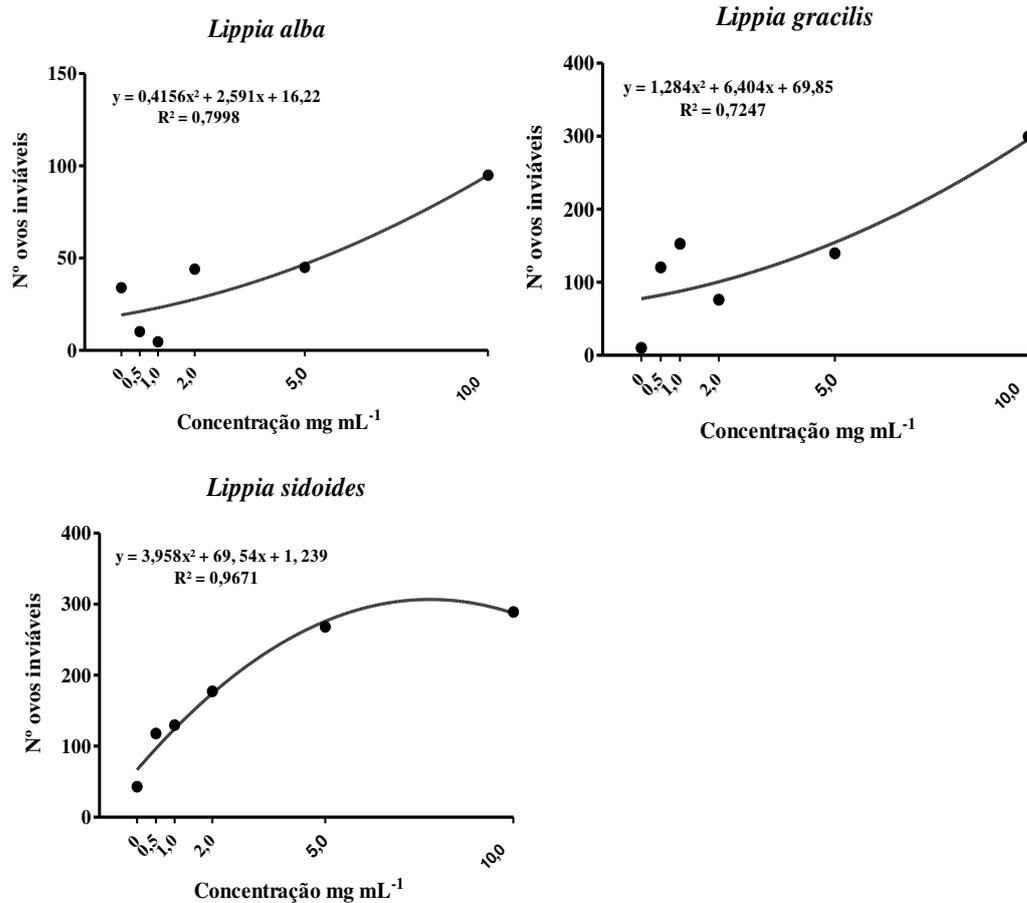
**Figura 10** - Eficácia (%) do óleo essencial de *Lippia gracilis* sobre a inviabilização dos ovos de *Neoechinorhynchus buttnerae*.

Com relação a eficácia dos tratamentos na inviabilização dos ovos de *N. buttnerae* o óleo essencial de *L. alba* (Fig. 10), teve baixa capacidade de inviabilização, causando menos de 35% de mortalidade mesmo na maior concentração utilizada, o que sugere que este óleo não é o mais indicado para o controle deste estágio do parasito.

Em contraste, o óleo de *L. sidoides* (Fig. 11) alcançou uma eficácia de mais de 40% já nas menores concentrações (0,5 e 1 mg mL<sup>-1</sup>), apresentando um efeito dose dependente. A maior concentração utilizada inviabilizou 100% dos ovos do acantocéfalo.

A concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> do óleo essencial de *L. gracilis* (Fig. 12) inviabilizou cerca de 40% dos ovos que foram contabilizados e, na maior concentração utilizada, o óleo essencial apresentou 100% de eficácia ovicida.

O modelo de regressão não-linear logística assimétrica (Fig. 9) utilizado para avaliar a correlação do uso de óleos com a inviabilização dos ovos, demonstrou que os óleos essenciais de *L. alba* e *L. gracillis* tiveram relação com a inviabilização dos ovos ( $R=0,7\%$ ) e o tratamento com a *L. sidoides*, apresentou maior fator de correlação entre a inviabilização de ovos e o uso dos óleos ( $R= 0,9\%$ ) sendo, portanto, o mais indicado para uso no controle dessa fase inicial do parasito. O uso do óleo de *Lippia gracilis* teve a mais baixa correlação com a mortalidade dos ovos (0,7247).



**Figura 11** - Curva de mortalidade dos ovos de *Neoechinorhynchus butnerae* expostos a diferentes concentrações dos óleos de *Lippia* spp.

## 2.4 DISCUSSÃO

As análises de composição dos óleos essenciais apresentaram a carvona como componente majoritário (58,2%) da *L. alba*, seguida pelo limoneno (19,2%), corroborando o estudo de Soares et al. (2016), que relataram composição semelhante de 61,7% e 17,5% dos respectivos compostos. Timol (72,2%) e p-cimeno (8,1%) foram os compostos fenólicos mais abundantes no óleo de *L. sidoides* utilizado neste estudo, diferentemente do relato de Botelho et al. (2007) que encontraram apenas 58,7% de timol e tiveram carvacrol (18,2%) como segundo componente majoritário sendo, este último, o componente principal (42,2%) do óleo de *L. gracilis*.

Em estudo, Hashimoto et al. (2016) e Soares et al (2017) observaram eficácia de 100% dos OEs de *L. sidoides* e *L. origanoides* contra monogenoides de brânquias de tilápia e tambaqui, nas concentrações de 320 e 160 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. A eficácia destes OEs e de seus componentes também já foi relatada contra bactérias patogênicas de peixes

(MAJOLO et. al., 2017; HEO et al., 2012) e protozoários (VALLADÃO, 2016; SOARES et al., 2017b). No presente estudo, o óleo essencial de *Lippia sidoides* apresentou maior eficácia ovicida contra o acantocéfalo *N. buttnerae*, provocando 80% de inviabilização dos ovos na concentração de 5 mg mL<sup>-1</sup>. O timol, composto majoritário presente neste óleo essencial, já tem sua eficácia comprovada contra larvas de nematódeos *Anisakis* spp. (GIARRATANA et al., 2014).

Ainda não há estudos que informem o mecanismo de ação dos óleos essenciais no revestimento corporal dos parasitos, mas alguns autores afirmam que o efeito anti-helmintico dessas substâncias se deve ao potencial lipofílico, que faz com que os óleos penetrem através das paredes fosfolipídicas, componentes das membranas de parasitos e bactérias (BAKKALLI et al., 2008). Em um estudo histoquímico dos envoltórios de ovos de *Acanthosentis* sp. (Acanthocephala), Anantaraman e Ravindranath (1975), relataram que a segunda camada dos ovos destes parasitos é composta por uma matriz glico-lipo-protéica, formando uma porção polissacarídica que é identificada como mucopolissacarídeo. Por ser altamente lipofílico, o componente majoritário da *Lippia sidoides* (timol) provavelmente foi o que reagiu com a membrana dos ovos e causou a sua inviabilização. Adicionalmente, Molan e Faraj (2010) relatam que o grupo radical fenólico presente nas estruturas químicas dos óleos essenciais, estão relacionados com a inibição das enzimas (proteases, lipases, quitinases, beta glucosidase e leucina aminopeptidase) chamadas de “enzimas de eclosão”, que são responsáveis por iniciar a eclosão de ovos de helmintos (MOLAN e FARAJ, 2010).

Os ovos encontrados no presente estudo apresentaram interstícios granulares entre as membranas, similarmente ao descrito por Tarachewski (1992). Além disso, foi possível observar a presença de células formando uma massa nuclear, também definida como mesoderme, originária da acantela (SCHIMIDT, 1985). A composição e a estrutura dos envoltórios de ovos de acantocéfalos estão diretamente relacionadas à sobrevivência de embriões no ambiente e a busca e captura dos ovos pelo hospedeiro intermediário. Além de preservar a viabilidade dos acântores no ambiente, a casca também deve protegê-los das enzimas digestivas nos intestinos dos hospedeiros finais e das seções do trato digestivo nos hospedeiros intermediários (NIKISHIN, 2001).

O primeiro envelope é derivado da membrana de fertilização, e possivelmente foi modificada em certo grau para que pudesse ser mantida em ambiente externo (NIKISHIN, 2001; WONGKHAM E WHITFIELD, 2004). Taraschewski et al. (1992) descreveram o segundo envelope, também chamado de envelope suplementar de *Neoechinorhynchus rutili* e destacaram a sua importância para a invasão do hospedeiro intermediário aquático. De acordo

com os autores, o envelope suplementar é caracterizado por uma membrana curva e é expelido quando o primeiro sofre alguma injúria. Tal envoltório absorve uma porção de água do ambiente, aumenta a estrutura do ovo e possibilita sua flutuação na superfície. Para exemplificar esse fato, Wongkham e Whitfield (2004) relataram que quando os ovos de *Pallisentis rexus* estão imersos na água, o envelope suplementar se equilibra e o volume da estrutura se expande. Isto resulta na flutuação dos ovos para a superfície, o que estreita a proximidade do ovo com o hospedeiro intermediário microcrustáceo e aumenta a sua chance de sobrevivência.

Nos estudos com acantocéfalos, existe uma discrepância acerca da quantidade de envoltórios que os ovos possuem, havendo relatos de duas (WARD, 1940), três (MERRITT E PRATT, 1964), quatro (UGLEM, 1972) e até cinco envoltórios (TARASCHEWSKI et al., 1992) de espécies do gênero *Neoechinorhynchus*. Porém, semelhante ao trabalho de Lourenço (2017), no presente estudo foi possível observar 3 envelopes revestindo a larva acântor. Em todos os casos, os elementos da parede de ovos são formados por uma camada de material semelhante a queratina (MARCHAND, 1984b; TARASCHEWSKI et al., 1992). Monne (1964) sugeriu que este componente pode ser formado a partir dos materiais sintetizados provenientes das reservas de glicogênio do acântor.

As informações sobre o controle de fases iniciais de acantocéfalos ainda são inexistentes, havendo estudos somente com a forma adulta do parasito, como o de Santos et al., (2018) que utilizaram OEs de *Piper hispidinervum* em adultos de *N. buttnerae* e relataram 100% de eficácia em apenas 15 min de exposição à concentrações a partir de 3,125 mg ml<sup>-1</sup>. Em outro estudo buscando formas de controle *in vitro* e *in vivo* de *N. rutili*, Taraschewski et al. (1990), testaram 20 quimioterápicos diferentes e encontraram eficácia em somente 2 deles, loperamida e niclosamida, sendo, este último, não recomendado para tratamentos de acantocefalose em peixes por causa de sua alta toxicidade para esses animais.

Em estudo de 2016, Rosny et al. (2016) relaam que ao utilizar 0,2 g Kg<sup>-1</sup> do extrato de alho (*Allium sativum*) na suplementação dietária de bagre *Clarias batrachus*, foi possível observar 80% de eficácia contra acantocéfalos. Também realizando suplementação alimentar, Costa et al. (2018) relataram eficácia de 100% com o óleo de *M. piperita* a 540 mg L<sup>-1</sup> em testes *in vitro* durante 24 h de exposição. Os mesmos autores também obtiveram 85% de eficácia contra *N. buttnerae* utilizando o óleo essencial de *Mentha piperita* a 0,54 g Kg<sup>-1</sup> em suplementação alimentar. Similarmente, Salaro (2017), relatou 100% de eficácia do óleo essencial de *M. piperita* a 400 mg L<sup>-1</sup> contra *N. buttnerae*. O autor também obteve alta

eficácia do óleo *Melaleuca alternifolia*, *Ocimum basilicum* e *Allium sativum*, contra este parasito em testes *in vitro*.

A partir disso, é possível observar que os óleos essenciais possuem potencial anti-helmíntico e são capazes de agir contra o desenvolvimento do acantocéfalo, podendo ser substitutos aos químicos utilizados no controle de parasitoses de peixe, devido às suas propriedades bioativas como baixa densidade e rápida difusão através das membranas celulares (potencial lipofílico), danificando as estruturas internas e membranas celulares dos parasitos, provocando lise celular. (SANTOS, 2018).

O presente estudo relatou 100% de eficácia na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup> de OE de *L. sidoides* contra ovos de *Neoechinorhynchus buttnerae* corroborando o estudo de Camurça-Vasconcelos et al. (2007), que utilizaram 1,75 mg mL<sup>-1</sup> do mesmo óleo e relataram a inibição de mais de 98% da eclosão do nematoide *Haemonchus contortus* em ratos. No presente estudo, os demais óleos utilizados na mesma concentração promoveram eclodibilidade de ovos significativamente maior que a mortalidade, demonstrando que mesmo que pertençam a um mesmo gênero e possuam uma estrutura química parecida, os óleos essenciais possuem componentes majoritários completamente distintos que podem ou não surtir um efeito satisfatório, mesmo em pequenas quantidades utilizadas.

Foi possível observar que somente as concentrações mais altas dos óleos de *L. gracilis* e *L. alba* (5 e 10 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente), causaram inviabilização significativa dos ovos, dificultando sua utilização na aquicultura por conta da quantidade excessiva e da dificuldade de obtenção do óleo essencial em grande escala. Adicionalmente, ressalta-se que o efeito dos óleos essenciais no organismo do hospedeiro definitivo ainda não é totalmente esclarecido.

Diante disso, é importante a continuidade de estudos nesta área, especialmente avaliando o efeito dos óleos essenciais do gênero *Lippia* na fisiologia do hospedeiro definitivo, além da investigação do mecanismo de ação dos óleos para a inviabilização dos ovos por rompimento dos envoltórios que recobrem a larva acântor, de forma que seja possível elucidar qual a verdadeira afinidade destes compostos com as estruturas dos ovos de acantocéfalo.

## 2.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro (CNPq 306635/2018-6) a M.L. Martins, bolsa de PDJ a G.T. Jerônimo (CNPq 405224/2017-6) e suporte financeiro (CNPq 402434/2016-1), a

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado a B.N.V. Serra. Este estudo foi financiado em parte pela CAPES, Brasil, Código Financeiro 001 e pela Embrapa (MP2 - 02.13.09.003.00.00) e Fapeam (PAPAC – 015/2014).

## REFERÊNCIAS

- André WP, Ribeiro WL, Cavalcante GS, dos Santos JM, Macedo IT, de Paula HC, Bevilaqua CM. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. *Vet Parasitol* 2016; 218 (1): 52–58.
- Andrés MF, González-Coloma A, Sanz J, Burillo J, Sainz P. Nematicidal activity of essential oils: a review. *Phytochem Rev* 2012; 11 (4): 371–390.
- Camurça-Vasconcelos ALF, Bevilaqua CML, Morais SM, Maciel MV, Costa CTC, Macedo ITF, Vieira LS. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Vet Parasitol* 2007; 148 (3): 288–294.
- Costa CMDS, Lima TBC, Cruz MGD, Almeida DV, Martins ML, Jerônimo GT. In vitro culture of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae): Influence of temperature and culture media. *Rev Bras Parasitol Vet* 2018; 27 (4): 562–569.
- Giarratana F., Muscolino D., Beninati C., Giuffrida A. & Panebianco A. Activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Anisakis larvae*. *Experimental Parasitology*. v. 1, n. 142, p. 7-10, 2014.
- Hashimoto GSO, Neto FM, Ruiz ML, Acchile M, Chagas EC, Chaves FCM. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture* 2016; 450 (1): 182–186.
- Heo JG., Kim CH, Park SC, Zoysa MD, Shin GW. Antimicrobial activity of thymol against pathogenic gram-negative bacteria of fishes. *Philipp J Vet Med* 2012; 49: 103–106.
- Kaplan RM, Storey BE, Vidyashankar AN, Bissinger BW, Mitchell, SM, Howell SB, Mason ME, Lee MD, Pedroso AA, Akashe A, Skrypec DJ. Antiparasitic efficacy of a novel plant-based functional food using an *Ascaris suum* model in pigs. *Acta Tropica* 2014; 139: 15-22.
- Kennedy CR. *Ecology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press. New York, USA, 2006, 249 p.
- Kulkarni RR, Pawar PV, Joseph MP, Akulwad AK, Sen A, Joshi SP. *Lavandula gibsoni* and *Plectranthus mollis* essential oils: chemical analysis and insect control activities against *Aedes aegypti*, *Anopheles sfttephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *J Pest Sci* 2013; 86 (4): 713-718.
- Macedo IT, Bevilaqua CM, de Oliveira LM, Camurça-Vasconcelos ALF, Vieira LDS, Oliveira FR, Chagas ADS. Atividade ovicida e larvicida in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18 (3): 62-66.

- Majolo C, da Rocha SIB, Chagas EC, Chaves FCM, Bizzo HR. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. *Aquac Res* 2017; 48 (5): 2380-2387.
- Malta JCO, Gomes ALS, Andrade SMS, Varella AMB. Massive infestation by *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956 (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) in young "tambaquis" *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultured in the Central Amazon. *Acta Amazonica* 2001; 31 (1): 133–143.
- Melo ACFL, Reis IF, Bevilaqua CML, Vieira LS, Echevarria FAM, Melo LM., Nematódeos resistentes a anti-helmínticos em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. *Cienc Rur* 2003; 33 (2): 339–344.
- Marchand JP. The elaboration of the acanthor shell of *Acanthosentis acan thuri* (Acanthocephala). *J Parasitol* 1984; 70 (1): 712–718.
- Merritt SV, Pratt I. The life history of *Neoechinorhynchus rutili* and its development in the intermediate host (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae). *J Parasitol* 1964; 50 (2): 394–400.
- Millezi, A. F., & Piccoli, R.H. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Rev. Bras. Pl. Med* 2014; 16 (1): 18–24.
- Monné L, Hönig G. On the embryonic envelopes of *Polymorphus botulus* and *P. minutus* (Acanthocephala). *Arkiv for Zoologi* 1954; 7 (3): 257–260.
- Nordi ECP, Costa RLD, David CMG, Parren GAE, Freitas ACB, Lameirinha LP, Katiki LM, Bueno MS, Quirino CR, Gama PE, Bizzo HR, Chagas ACS. Supplementation of moist and dehydrated citrus pulp in the diets of sheep artificially and naturally infected with gastrointestinal nematodes on the parasitological parameters and performance. *Vet Parasitol* 2014; 205 (3): 532–539.
- Nikishin VP. The structure and formation of embryonic envelopes in acanthocephalans. *Biol Bull Russian Acad Sci* 2001; 28 (1): 40–53.
- Schmidt GD. Development and life cycles. In: Crompton DWT, Nickol BB. *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University, 1985. <http://digitalcommons.unl.edu/parasitologyfacpubs/504>. Acesso em 20/03/2019.
- Santos W B, Majolo C, dos Santos DS, Rosa MC, Monteiro PC, Souza Rocha MJ., Chagas EC. *In vitro* efficacy of essential oils of Piperaceae species in the control of acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae*. *Braz J Hyg Anim San* 2018; 12 (4): 460–469.
- Soares BV, Tavares-Dias M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazônia* 2013; 3 (1): 109–123.
- Soares BV, Neves LR, Ferreira DO, Oliveira MSB, Chaves FCM, Chagas EC, Tavares-Dias M. Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). *Vet Parasitol* 2017; 234: 49–56.

- Soares BV, Cardoso ACF, Campos RR, Gonçalves BB, Santos GG, Chaves FCM, Chagas EC, Tavares-Dias M. Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. *Aquaculture* 2017; 469: 72–78.
- Taraschewski H, Mehlhorn H, Raether W. Loperamid, an efficacious drug against fish-pathogenic acanthocephalans. *Parasitol Res* 1990;76 (7): 619–623.
- Taraschewski H., Peters W. Comparative investigations of the morphology and chemical composition of the eggshell of Acanthocephala. II. Palaeacanthocephala. *Parasitol Res* 1992; 78 (5): 376–381.
- Taraschewski H. Host–parasite interactions in Acanthocephala: a morphological approach. *Adv Parasitol* 2000; 46: 1–179.
- Tavares-Dias M. Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. *Aquat Liv Res* 2018; 31 (1): 10–13.
- Tavares-Dias M, Moraes FR, Martins ML, Kronka SN. Fauna parasitária de peixes oriundos de pesque-pagues do município de Franca, São Paulo Brasil. II. Metazoários. *Rev Bras Zool* 2001; 18: 81–95.
- Uglem GL. The life cycle of *Neoechinorhynchus cristatus* Lynch, 1936 (Acanthocephala) with notes on the hatching of eggs. *J Parasitol* 1972; 58 (6): 1071–1074.
- Valladão GMR, Gallani SU, Ikefuti CV, Cruz C, Levy-Pereira N, Rodrigues MVN, Pilarski F. Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. *J Fish Dis* 2016; 39 (10): 1143–52.
- Ward HL. Studies on the life history of *Neoechinorhynchus cylindratus* (Van Cleave, 1913) (Acanthocephala). *Trans Am Microsc Soc* 1940; 59 (3): 327–347.
- Wongkham W, Whitfield PJ. *Pallisentis rexus* from the Chiang Mai Basin, Thailand: ultrastructural studies on egg envelope development and the mechanism of egg expansion. *J Helminthol* 2004; 78 (1): 77–85.
- Zhu L., Dai JL, Yang L, Qiu J. In vitro ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). *Vet Parasitol* 2013; 195 (2): 112–117.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostra que, de fato, existe uma substância fitoterápica capaz de inviabilizar os ovos de *N. buttnerae*, sendo um ponto de partida para estudos posteriores com as formas de aplicação mais eficazes destas substâncias. A estrutura dos ovos de *N. buttnerae* é similar aos de espécies do mesmo gênero, mas ainda são necessários estudos que abordem a composição dos envoltórios do ovo do *N. buttnerae*, além de testes com outras substâncias fitoterápicas

Com relação aos tratamentos, observou-se que os óleos essenciais, embora do mesmo gênero, têm composições químicas totalmente distintas entre si, podendo ou não surtir efeito mesmo em baixas concentrações utilizadas. Estudos posteriores abordando a viabilidade econômica do cultivo de plantas medicinais para extração e comercialização dos fitoterápicos devem ser realizados, afim de facilitar a utilização destas substâncias no controle de parasitoses em peixes. Além disso, a avaliação do efeito dos óleos de *Lippia* spp. na fisiologia do hospedeiro definitivo também é necessária para comprovação do potencial anti-helmíntico dessas substâncias sem que seja prejudicial para o hospedeiro definitivo.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ANDRÉ, W P. P. et al. Essential oils and their bioactive compounds in the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, n. 1, p. 14, 2018.
- AGUIAR, L. S. et al. Distribution of the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* and semiquantitative analysis of histopathological damage in the intestine of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Parasitology Research**, v. 117, n. 6, p. 1689-1698, 2018.
- ALVES, C.M.G. et al. Albendazole, levamisole and ivermectin are effective against monogeneans of *Colossoma macropomum* (Pisces: Serrasalmidae). **Journal of fish diseases**, v. 42, n. 3, p. 405-412, 2019.
- AMIN, O.M. et al. The description and histopathology of *Leptorhynchoides polycristatus* n. sp. (Acanthocephala: Rhadinorhynchidae) from sturgeons, *Acipenser* spp. (Actinopterygii: Acipenseridae) in the Caspian Sea, Iran, with emendation of the generic diagnosis. **Parasitology research**, v. 112, n. 11, p. 3873-3882, 2013.
- AQUINO, S.L.A et al. Levantamento parasitário de tambaqui (*Colossoma macropomum*) criado em pisciculturas do município de Rio Preto da Eva (AM) no período das chuvas. In: **Anais do Encontro Brasileiro De Patologistas De Organismos Aquáticos**, 13, 2014. Aracaju, 2014. CD-ROM.
- ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; GOMES, L.C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: Baldisserotto, B. (Eds). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Vol. 1. Santa Universidade Federal Santa Maria, Rio Grande do Sul, v. 1, p. 67-104, 2005
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils –a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- Barroso, G. M. Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa: UFV. v. 3, p. 255, 1991
- BRUNI, R et al. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.(Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 415-421, 2004.
- CUNHA, M. A et al. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, n. 1-4, p. 403-406, 2010.
- CHAGAS, E. C. et al. Desempenho de tambaqui cultivado em tanques-rede, em lago de várzea, sob diferentes taxas de alimentação. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 40, n. 8, 2005.
- CHAGAS, E. C. et al. *Neoechinorhynchus buttnerae* parasitic infection in tambaqui (*Colossoma macropomum*) on fish farms in the state of Amazonas. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 45, n. 2, 2019.
- DEZFULI, B S. et al. Inflammatory response to *Dentitruncus truttae* (Acanthocephala) in the intestine of brown trout. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, n. 6, p. 726-733, 2008.

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

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 p.

FARIAS-JUNIOR, P A. et al. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 399-402, 2012.

LOURENÇO, F.S; MOREY, G. A. M; MALTA, J.C. The development of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) in its intermediate host *Cypridopsis vidua* in Brazil. **Acta parasitologica**, v. 63, n. 2, p. 354-359, 2018.

GANDRA, A. L. **O mercado de pescado da região metropolitana de Manaus. Série: O mercado de pescado nas grandes cidades latino-americanas**. CFC/FAO/INFOPECA, 91p, 2010.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary parasitology**, v. 139, n. 4, p. 308-320, 2006.

GOLVAN, Y. J. Acanthocéphales d'Amazonie. Redescription d'Oligacanthorhynchus iheringi Travassos 1916 et description de Neoechinorhynchus buttnerae n. sp.(Neoacanthocephala-Neoechinorhynchidae). **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 31, n. 5-6, p. 500-524, 1956.

GOMES, G. A. et al. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 111, n. 6, p. 2423-2430, 2012.

GOVEN, B. A.; AMEND, D. F. Mebendazole/trichlorfon combination: a new anthelmintic for removing monogenetic trematodes from fish. **Journal of Fish Biology**, v. 20, n. 4, p. 373-378, 1982.

GOVIND, P.; MADHURI, S.; MANDLOI, A. Immunostimulant effect of medicinal plants on fish. **International Research Journal of Pharmacy**, 3, 112-114, 2012

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

HIRAZAWA, N.; OHTAKA, T; HATA, K. Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*. **Aquaculture**, v. 188, n. 1-2, p. 1-13, 2000.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE. 2016. Produção da Pecuária mundial, Rio de Janeiro, 44, 1- 51.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE, 2017. IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – Sidra. Pesquisa Pecuária Municipal. Produção da aquicultura, por

tipo de produto. IBGE: 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940#resultado>. Acesso em: 10 maio. 2019.

JERÔNIMO, G.T et al. *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: a pathological approach. **Aquaculture**, v. 469, p. 124-127, 2017.

NÚÑEZ DE LA ROSA, Melisa Giset et al. Evaluación preliminar de las poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a aceites esenciales de orégano en la dieta. 2011. Tese de Doutorado. Universidad Nacional de Colombia.

MACIEL, P.O.; AFFONSO, E.G.; ONAKA, E.M. Infestação massiva por *Neoechinorhynchus* sp. (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis, *Colossoma macropomum*, jovens de piscicultura de Itacoatiara-AM, Brasil. In: X Encontro Brasileiro De Patologistas De Organismos Aquáticos, Búzios, Rio de Janeiro. 2008.

MACEDO, I. T. F. et al. Atividade ovicida e larvicida in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 62-66, 2009.

MALTA, J.C.O et al. Massive infestation by *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956 (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) in young "tambaquis" *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultured in the Central Amazon. **Acta Amazonica**, v. 31, n. 1, p. 133-143, 2001.

MARINHO, R. G. B. et al. Helminthes and protozoan of farmed pirarucu (*Arapaima gigas*) in eastern Amazon and host-parasite relationship. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 4, p. 1192-1202, 2013.

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

MARTINS, M. L. et al. Mebendazole treatment against *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea, Dactylogyridae) gill parasite of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) in Brazil. Efficacy and hematology. **Acta Parasitologica**, v. 46, n. 4, p. 332-336, 2001.

MAJOLO, C. et al. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture research**, v. 48, n. 5, p. 2380-2387, 2017.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Hortic. bras**, v. 27, n. 2, p. 3299-3302, 2009.

MOREIRA, F.J.C; SANTOS, C.D.G; INNECCO, R. Hatching and mortality of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* race 2 in essential plant oils. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 40, n. 3, p. 441, 2009.

NERY, P. S. et al. Effects of *Anacardium humile* leaf extracts on the development of gastrointestinal nematode larvae of sheep. **Veterinary parasitology**, v. 171, n. 3-4, p. 361-364, 2010.

DE OLIVEIRA, M.I.B et al. The digestive tube of *Piaractus brachypomus*: gross morphology, histology/histochemistry of the mucosal layer and the effects of parasitism by *Neoechinorhynchus* sp. **Journal of fish biology**, v. 94, n. 4, p. 648-659, 2019.

NÚÑEZ, V.; DRAGO, F.B. Phylum Acanthocephala. In: Drago, F. B. *Macroparásitos: Diversidad Y Biología*, 8: 112-125, 2017

QUESADA, S.P; PASCHOAL, J.A.R; REYES, Felix G.R. Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for fluoroquinolones -a review. **Journal of food science**, v. 78, n. 9, p. R1321-R1333, 2013.

PEIXE BR. Anuário Peixe BR da Piscicultura 2018. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/Anuario2018/AnuarioPeixeBR2018.pdf>. Acesso em: 09 fev. 2019.

PEIXOTO, M.G et al. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary parasitology**, v. 210, n. 1-2, p. 118-122, 2015.

REARDON, I. S.; HARRELL, R. M. Acute toxicity of formalin and copper sulfate to striped bass fingerlings held in varying salinities. **Aquaculture**, v. 87, n. 3-4, p. 255-270, 1990.

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

ROSNY, H.S et al. Dietary supplementation of garlic (*Allium sativum*) to prevent Acanthocephala infection in aquaculture. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 4, n. 3, p. 188-192, 2016.

SANIL, N. K. et al. Pathological manifestations of the acanthocephalan parasite, *Tenuiproboscis* sp. in the mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) (Forsskål, 1775), a candidate species for aquaculture from Southern India. **Aquaculture**, v. 310, n. 3-4, p. 259-266, 2011.

SILVA-GOMES, A.L et al. The impact of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Golvan, 1956) (Eoacanthocephala: Neochinorhynchidae) outbreaks on productive and economic performance of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), reared in ponds. **Latin american journal of aquatic research**, v. 45, n. 2, p. 496-500, 2017.

SILVA, N. A. et al. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) NE Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 52-55, 2006.

SOARES, B.V. et al. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. **Aquaculture**, v. 452, p. 107-114, 2016.

SOARES, B.V; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazonia**, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

- SPRENGER, L.K. et al. Atividade ovicida e larvicida do extrato hidroalcoólico de *Artemisia annua* sobre *Haemonchus contortus*. **Archives of Veterinary Science**, v. 21, n. 4, 2016.
- SUTILI, F. J. et al. *Lippia alba* essential oil promotes survival of silver catfish (*Rhamdia quelen*) infected with *Aeromonas* sp. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 1, p. 95-100, 2015.
- TAVARES-DIAS, M. & MORAES, FR. 2004. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: Villimpress. 144 p.
- TAVARES-DIAS, M; MARTINS, ML. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of parasitic diseases**, v. 41, n. 4, p. 913-918, 2017.
- TARASCHEWSKI, H.; MEHLHORN, H.; RAETHER, W. Loperamid, an efficacious drug against fish-pathogenic acanthocephalans. **Parasitology research**, v. 76, n. 7, p. 619-623, 1990.
- 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, 2018.
- TARASCHEWSKI, H. Host-parasite interactions in Acanthocephala: A morphological approach. **Advances in parasitology**, v. 46, p. 1-179, 2000.
- TOJO, J.; SANTAMARINA, M.T.; UBEIRA, F.M.; ESTEVEZ, J.; SANMARTIN, M.L. Anthelmintic activity of benzimidazoles against *Gyrodactylus* sp. infecting rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 12, p. 185-189, 1992.
- VALLADÃO, G. M. R., GALLANI, S. U., IKEFUTI, C. V., DA CRUZ, C., LEVY-PEREIRA, N., RODRIGUES, M. V. N., & PILARSKI, F. Essential oils to control ichthyophthiriasis in pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg): special emphasis on treatment with *Melaleuca alternifolia*. **Journal of fish diseases**, v. 39, n. 10, p. 1143-1152, 2016.
- VALLADÃO, G. M. R., GALLANI, S. U., KOTZENT, S., ASSANE, I. M., & PILARSKI, F. Effects of dietary thyme essential oil on hemato-immunological indices, intestinal morphology, and microbiota of Nile tilapia. **Aquaculture International**, v. 27, n. 2, p. 399-411, 2019.
- WARD, H. L. et al. Studies on the life history of *Neoechinorhynchus cylindratus* (Van Cleave, 1913) (Acanthocephala). **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 59, n. 3, p. 327-347, 1940.
- XU, D.H; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. Evaluation of a cohabitation challenge model in immunization trials for channel catfish *Ictalurus punctatus* against *Ichthyophthirius multifiliis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 74, n. 1, p. 49-55, 2007.