



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-AMAPÁ
INSTITUTO DE PESQUISAS CIENTÍFICAS E TECNOLÓGICAS DO ESTADO DO AMAPÁ
CONSERVAÇÃO INTERNACIONAL DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE TROPICAL
UNIFAP/EMBRAPA-AP/IEPA/CI-BRASIL/PPGBIO

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* (LAMIACEAE) NO CONTROLE
DE MONOGENOIDEAS DAS BRÂNKUIAS DE *Arapaima gigas*
(ARAPAIMIDAE)**

DAYNA FILOCREÃO MALHEIROS

Macapá-AP
2014

DAYNA FILOCREÃO MALHEIROS

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* (LAMIACEAE) NO CONTROLE
DE MONOGENOIDEAS DAS BRÂNQUIAS DE *Arapaima gigas*
(ARAPAIMIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Biodiversidade Tropical - PPGBIO/ Universidade Federal do Amapá - UNIFAP, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Marcos Tavares Dias

**Macapá-AP
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

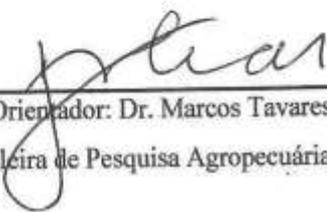
597

M249o Malheiros, Dayna Filocreão.

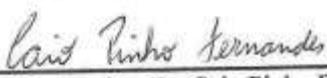
1.1.1 Óleo essencial de *Mentha piperita* (Lamiaceae) no controle de monogenoideas das brânquias de *Arapaima gigas* (Arapaimidae) / Dayna Filocreão Malheiros; orientador, Marcos Tavares Dias. -- Macapá, 2014.
49 f.

Dayna Filocreão Malheiros

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* (LAMIACEAE) NO CONTROLE DE
MONOGENOIDEAS DAS BRÂNCULAS DE *Arapaima gigas* (ARAPAIMIDAE).**

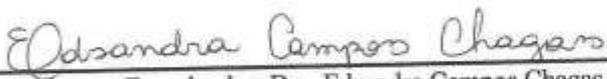

Orientador: Dr. Marcos Tavares Dias

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Amapá



Examinador: Dr. Caio Pinho Fernandes

Universidade Federal do Amapá - UNIFAP



Examinador: Dra. Edsandra Campos Chagas

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Amazônia Ocidental

Macapá, 12 de dezembro de 2014

Aos meus pais, Inakê e Dalton,
por todo incentivo na realização dos meus sonhos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- ✓ À Universidade Federal do Amapá – UNIFAP e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical – PPGGIO, por possibilitar meu ingresso ao mundo científico.
- ✓ À Embrapa Amapá por proporcionar toda logística necessária ao desenvolvimento desta pesquisa.
- ✓ Ao CNPq e Embrapa, pelo financiamento do projeto.
- ✓ Ao pesquisador Dr. Marcos Tavares Dias, pela orientação, dedicação, paciência e compreensão diante às minhas dificuldades e, principalmente, pela oportunidade, confiança e ensinamentos durante o desenvolvimento desta dissertação.
- ✓ À pesquisadora MSc. Patrícia Oliveira Maciel por toda ajuda durante a minha estadia na Embrapa Aquicultura e Pesca - Palmas (TO), principalmente na realização do experimento *in vitro*.
- ✓ À Profa. Dra. Rossineide Martins Rocha por disponibilizar o laboratório de histologia e pelos ensinamentos prestados.
- ✓ Ao Prof. Dr. Alan Cunha por ter cedido o laboratório de ciências ambientais e seus equipamentos para realização de mais uma etapa da minha pesquisa.
- ✓ Ao laboratório de sanidade aquática da Embrapa-Amapá, em especial aos queridos Aristides Ferreira, Bruna Soares, Douglas Pinheiro, Huann Vasconcelos, Lígia Rigor, Marcos Sidney, Márcia Kelly e Raissa Gonçalves pela amizade e por toda ajuda no laboratório.
- ✓ Aos colegas da turma PPGGIO 2013, pelo companheirismo e bons momentos compartilhados, Alinny Lima, Carlos Abreu, Maisa Otake, Tiago Costa, Suzana Ribeiro e Zenaide Miranda.
- ✓ À amiga Samara Xavier, pela amizade e por estar presente nas mais diversas situações da vida.
- ✓ À minha família, Dalton, Inakê e Flávia, por estarem sempre ao meu lado, apoiando e encorajando.
- ✓ A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

PREFÁCIO

Este trabalho possui um capítulo (artigo), seguindo o formato alternativo proposto pelas Normas de Diretrizes para Normalização de documento impresso e eletrônico de Teses e Dissertações da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) de 2005, indicado pelo colegiado do Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO). Dentro de tais normas foram adotadas norma Vancouver até as referências da introdução geral. O artigo intitulado “**Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Mentha piperita* (Lamiaceae) em *Dawestrema* spp. (Monogenoidea) e toxicidade aguda em *Arapaima gigas* (Arapaimidae)**” seguiu as normas do periódico Acta Amazonica, para o qual foi previamente submetido (Anexo).

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar a eficácia *in vitro* do óleo essencial de *Mentha piperita* no controle dos monogenoideas das brânquias de *Arapaima gigas*, bem como avaliar a toxicidade e os efeitos histológicos desse produto natural para esse peixe de água doce. No ensaio *in vitro*, *A. gigas* naturalmente parasitados por *Dawestrema cycloancistrum* e *Dawestrema cycloancistrioides* foram usados e suas brânquias coletadas e expostas a 0, 80, 160 e 320 mg/L de óleo essencial de *M. piperita*. Todas essas concentrações de óleo essencial de *M. piperita* foram 100% eficazes, *in vitro*, contra *Dawestrema* spp. das brânquias de *A. gigas*. Testes de toxicidade aguda foram realizados usando 168 alevinos de *A. gigas*, distribuídos em 14 tanques (12 peixes/tanque) e expostos a 0, 20, 40, 80, 100, 130, 160 mg/L de óleo essencial de *M. piperita*. Os resultados foram calculados pelo método “Trimmed Serman Karber” e mostrou que a concentração letal (CL_{50-4h}) foi de 38 mg/L. Houve diferenças na mortalidade dos peixes em relação às concentrações usadas durante o teste de toxicidade aguda. O primeiro arco branquial direito dos peixes expostos ao óleo essencial de *M. piperita* foi usado e processado para análises histológicas pelo método usual (fixação em formol 10% tamponado, descalcificação, desidratação, inclusão em parafina, corte de 6 µm) e coloração com hematoxilina-eosina. Nos peixes do tratamento controle e naqueles expostos as concentrações de 20 e 40 mg/L de óleo essencial de *M. piperita* não ocorreram alterações teciduais nas brânquias, enquanto naqueles expostos a 80, 100, 130 e 160 mg/L ocorreram elevações epiteliais, fusão das lamelas secundárias, hipertrofia e aneurisma, mas necrose foi observada somente quando 160 mg/L de óleo essencial de *M. piperita* foi usada. O óleo essencial de *M. piperita* possui atividade anti-helmíntica e foi tóxico para *A. gigas* nas maiores concentrações testadas. Assim, banhos terapêuticos poderão ser realizados usando óleo essencial de *M. piperita* somente com concentrações em torno de 20 mg/L.

Palavras-chaves: Produto natural, Parasitas, Peixes, Toxicidade.

ABSTRACT

This study aimed to investigate *in vitro* efficacy of *Mentha piperita* essential oil in control of monogenoideas *Arapaima gigas* gills and to evaluate the toxicity and histological effects of this natural product for this fish. For *in vitro* assay, *A. gigas* naturally infested by *Dawestrema cycloancistrum* and *Dawestrema cycloancistrioides* were used and collected its gills and exposed to 0, 80, 160 and 320 mg/L of essential oil *M. piperita*. The results showed that all these *in vitro* concentrations tested were effective (100%) against *Dawestrema* spp. from gills of *A. gigas*. Acute toxicity test was performed using 168 *A. gigas* fingerlings, distributed in 14 tanks (12 fish/tank) and exposed 0, 20, 40, 80, 100, 130, 160 mg/L of *M. piperita* essential oil. The results of toxicity test were calculated using Trimmed Spearman Karber method and showed that the lethal concentration (CL_{50-4h}) was 38 mg/L. There were differences in the mortality of fish in relation to the concentrations used in the acute toxicity test. The first gill arch right of fish exposed to the essential oil of *M. piperita* were used and processed for histological analysis by the usual methods (fixation in 10% buffered formalin, decalcification, dehydration, embedded in paraffin, cut of 6 microns) and stained with hematoxylin-eosin. There was not tissue changes in gills of fish of the control group and those exposed to 20 and 40 mg/L the essential oil of *M. piperita*, while in fish exposed to 80, 100, 130 and 160 mg/L occurred elevations epithelial, fusion of secondary lamellae, hypertrophy and aneurysm, but necrosis occurred only when 160 mg/L essential oil of *M. piperita* was used. The essential oil of *M. piperita* has anthelmintic activity and was toxic to *A. gigas* in the highest concentrations tested. Thus, therapeutic baths may be made using essential oil of *M. piperita* only in concentrations around 20 mg/L.

Key words: Natural product, Parasites, Fish, Toxicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1 Pirarucu <i>Arapaima gigas</i>	13
1.2 Parasitos de <i>Arapaima gigas</i>	14
1.3 Uso de plantas medicinais no tratamento de doenças em peixes	16
1.4 <i>Mentha piperita</i> Linnaeus 1753 (Lamiaceae)	17
1.5 Toxicidade aguda em peixes	18
2 PROBLEMA	20
3 HIPÓTESES	21
4 OBJETIVOS	22
5 REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 1	32
Efeito <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>Mentha piperita</i> (Lamiaceae) em <i>Dawestrema</i> spp. (Monogenoidea) e toxicidade aguda em <i>Arapaima gigas</i> (Arapaimidae)	32
RESUMO	34
ABSTRACT	35
INTRODUÇÃO	36
MATERIAL E MÉTODOS	37
Obtenção do óleo essencial de <i>Mentha piperita</i>	37
Peixes e aclimação	38
Ensaio <i>in vitro</i> com óleo essencial de <i>Mentha piperita</i>	38
Teste de toxicidade aguda (CL_{50-4 h}) com <i>Mentha piperita</i>	39
Análises histológicas das brânquias de <i>Arapaima gigas</i>	39
RESULTADOS	40
DISCUSSÃO	45
AGRADECIMENTOS	47
BIBLIOGRAFIA CITADA	47

1 INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura é uma atividade em expansão no mundo, cresce em torno de 6,3% ao ano (Leung e Bates, 2012), sendo atualmente responsável por 45% da produção de animais aquáticos usados para a alimentação do homem (Araújo et al., 2009a). Estima-se que em 2013 a produção mundial de pescado foi cerca de 160 milhões de toneladas e o consumo aproximadamente 20 kg/habitante/ano (Rocha et al., 2013). O crescimento da aquicultura tem sido influenciado pelo aumento da demanda mundial por alimentos de origem protéica e carnes brancas, bem como pelo alto valor de mercado de pescados (Camargo e Pouey, 2005; Matthiensen et al., 2009; Rocha et al., 2013) e também, por ser uma ótima alternativa para minimizar a intensa exploração dos estoques pesqueiros naturais (Camargo e Pouey, 2005) de diversas regiões do planeta.

O Brasil ocupa o 19º lugar no ranque mundial da produção de pescado (MPA, 2013). Destaca-se por apresentar condições naturais favoráveis para o desenvolvimento das diversas modalidades da aquicultura, pois possui mais de 8.000 km de zona costeira e cinco milhões de hectares de água doce em reservatórios naturais e artificiais, além de grande diversidade de espécies, clima adequado ao cultivo e áreas apropriadas ao incremento da atividade, bem como por apresentar 13% da água doce disponível no planeta (Ono e Kubitzka, 1999; Ono, 2005; Camargo e Pouey, 2005, Pavanelli et al., 2008; Rocha et al., 2013). Em 2011, a produção aquícola nacional teve um incremento de 31,1% em relação ao ano anterior, sendo a maior parcela oriunda da aquicultura continental, destacando a piscicultura com 86,6% da produção total (MPA, 2013). Esse crescimento da piscicultura no país pode ser reflexo das políticas públicas voltadas para esse setor, as quais contribuíram para o acesso aos programas desenvolvidos pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2013). Porém, o consumo de pescado ainda é baixo no país, mesmo tendo aumentado nos últimos anos para 11,17 kg/habitante/ano, porque o mínimo recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é 12 kg/habitante/ano (Rocha et al., 2013).

A piscicultura é a atividade da aquicultura que mais cresce no Brasil, com diversas espécies nativas e não nativas cultivadas por pequenos e médios produtores (Pavanelli et al., 2008; MPA, 2013), devido à ótima aceitação do peixe no mercado. Dentre as espécies de peixes não nativos destaca-se a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e carpa (*Cyprinus carpio*), cuja produção em 2011 foi 253.824,1 e 38.079,1

toneladas; respectivamente. Entre as espécies nativas com crescente interesse para os piscicultores destaca-se o pirarucu (*Arapaima gigas*), peixe de grande valor econômico para a Amazônia (Drumond et al., 2010) e alguns estados da região nordeste do país, já que sua carne tem ótima aceitação (Brandão et al., 2006, 2008) e por seu excelente desempenho zootécnico (Ono et al., 2004).

Em geral, com o incremento da piscicultura intensiva vem ocorrendo também um aumento da incidência de doenças infecciosas e parasitárias (Martins et al., 2004; Schalch e Moraes, 2005; Azevedo et al., 2006; Zanollo e Yamamura, 2006; Araújo et al., 2009a; Silva et al., 2013), causadas por estresse, alta densidade de estocagem, baixa qualidade da água e falta de boas práticas de manejo (Pavanelli et al., 2008; Silva et al., 2013). Na região amazônica, o cultivo intensivo de *A. gigas* tem as doenças como fator limitante para o incremento da criação (Cavero et al., 2003b, Delgado et al., 2007, Marinho et al., 2013), somada a falta de produção de alevinos, os quais são mais susceptíveis as enfermidades (Marinho et al., 2013). Portanto, há necessidade de melhorias na prevenção de doenças em pirarucus, principalmente na fase inicial do cultivo.

Na piscicultura, a profilaxia e o tratamento de doenças, em geral, são realizados com uso de substâncias químicas que podem causar problemas, como: seleção de organismos resistentes, agressão ao meio ambiente (Maximiano et al., 2005; Mouriño et al., 2012), acúmulo de resíduos químicos no pescado oferecendo risco a saúde do consumidor (Chagas, 2004).

Tais problemas têm estimulado a investigação do uso de plantas medicinais como alternativa para profilaxia e tratamentos de doenças em peixes (Ravikumar et al., 2010; Harikrishnan et al., 2011, Madhuri et al., 2012a,b; Pandey, 2013), uma vez que contém diversos componentes bioativos como polissacarídeos, ácidos orgânicos, alcalóides, glicosídeos e óleos voláteis (Pandey, 2013; Soares e Tavares-Dias, 2013). Assim, amendoeira *Terminalia catappa* (Chitmanat et al., 2005a,b; Claudiano et al., 2009), alho *Allium sativum* (Chitmanat et al., 2005b; Shalaby et al., 2006; Sahu et al., 2007, Diab et al., 2008; Metwally, 2009; Nya e Austin, 2009), cominho-negro *Nigella sativa* (John et al., 2007; Diab et al., 2008), equinácias *Echinacea* spp. (John et al., 2007; Mesalhy et al., 2007) e nim *Azadirachta indica* (Cruz et al., 2008) têm sido testadas na forma de banhos ou adicionadas a dieta de diferentes espécies de peixe.

Outras plantas com propriedades medicinais são as do gênero *Mentha*, que desde tempos remotos têm sido usadas como ervas medicinais e aromáticas (Edris,

2006; Mckay e Blumberg, 2006; Peixoto et al., 2009; Maggiore et al., 2012). Na medicina popular são conhecidas como hortelãs ou mentas, usadas para tratar náuseas, vômitos, indigestão, desordens estomacais, cólicas menstruais e verminoses (Mckay e Blumberg, 2006; Girme et al., 2006; Peixoto et al., 2009). As propriedades farmacêuticas dessas plantas podem ser encontradas particularmente em óleos essenciais (Edris, 2006; Maggiore et al., 2012).

Estudos com extrato ou óleo essencial de *Mentha piperita* têm demonstrado atividades anti-helmíntica (Girme et al., 2006; Nikesh et al., 2011, Maggiore et al., 2012), antibacteriana (Yadegarinia et al., 2006), antiprotozoária (Vidal et al., 2007) e antifúngica (Yadegarinia et al., 2006; Matos et al., 2009) *in vitro*. Todavia, não há estudos sobre a atividade antiparasitária de *M. piperita* em espécies de peixes.

1.1 Pirarucu *Arapaima gigas*

Arapaima gigas é um Arapaimidae de escamas, de grande porte, com cabeça achatada, ossificada e corpo alongado, conhecido popularmente como pirarucu. Esse importante peixe de água doce é endêmico da bacia amazônica, encontrado especificamente nas áreas de várzeas e florestas inundadas (Castello, 2008). Apresenta cuidado parental, realiza construção de ninhos, tem desova parcelada e possui maturidade sexual relativamente tardia (Cavero e Fonseca, 2008), sendo muito vulnerável à pesca durante sua desova (Castello e Stewart, 2010). Está entre os peixes de maior interesse para a conservação (Allan et al., 2005), porque suas características gerais parecem permitir a exploração sustentável, no entanto, estudos sobre implementação de procedimentos não prejudiciais para peixes tropicais apontam que esses procedimentos não podem garantir a sustentabilidade das populações naturais desse peixe no Brasil, devido à falta de capacidade de monitoramento, gerenciamento e escassez de informações técnicas sobre a espécie (Castello e Stewart, 2010). Assim, o cultivo pode ser uma boa medida para minimizar esse problema.

O pirarucu pode alcançar até 200 kg e 3 m de comprimento na natureza (Portes-Santos et al., 2008; Araújo et al., 2009 a,b; Pereira-Filho e Roubach, 2010; Nuñez et al., 2011). Tem respiração aérea, com auxílio da bexiga natatória altamente vascularizada, característica que facilita sua criação em ambientes com baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água (Cavero et al., 2003a,b; Ono et al., 2004),

quando os níveis de gás carbônico não são críticos. Tem hábito alimentar carnívoro, motivo pelo qual sua exigência por proteína é elevada (Ituassú, 2002), mas no cultivo pode ser treinado para receber alimentação artificial. Existem ainda expectativas de melhoria no desempenho desse peixe (Cavero et al., 2003b; Ono et al., 2004), bem como em aumentar a produção de alevinos. Assim, esse peixe é uma das espécies amazônicas mais promissoras para criação em cativeiro na região, em função da sua alta taxa de crescimento (Ono et al.; 2003, 2004; Queiroz et al., 2004), rusticidade no manuseio (Andrade et al., 2007), adaptabilidade a alimentação artificial (Ono et al., 2008), de não manifestar canibalismo quando confinado em altas densidades (Cavero, 2002) e ter carne magra e livre de espinhas intramusculares (Nuñez et al., 2011). Em 2011, a produção de pirarucu cultivado nos estados da região Norte e também nos estados de Mato Grosso e Bahia foi 1.262,4 toneladas (MPA, 2013).

No Brasil, há pisciculturas direcionadas para reprodução e produção de juvenis e outras para engorda especializadas em criar esse peixe até o tamanho de abate (Brandão et al., 2008), contudo nenhuma criação com grande produtividade. O cultivo deste peixe apresenta doenças como fator limitante para o incremento da criação (Cavero et al., 2003b, Delgado et al., 2007, Marinho et al., 2013), somada a falta de produção de alevinos, os quais são mais susceptíveis as enfermidades (Marinho et al., 2013). Portanto, há necessidades de melhorias na prevenção de doenças em pirarucus, principalmente na fase inicial do cultivo.

1.2 Parasitos de *Arapaima gigas*

Diversos ectoparasitos e endoparasitos ocorrem em peixes de pisciculturas e podem causar doenças no plantel quando encontram condições favoráveis para sua proliferação (Tavechio et al., 2009; Madhuri et al., 2012b). As parasitoses podem causar prejuízos econômicos para a piscicultura, reduzindo o crescimento e ocasionando grande mortalidade de peixes (Pavanelli et al., 2008), além de elevar os gastos com tratamentos (Araújo et al., 2009a, Tavechio et al., 2009), que nem sempre são eficazes. Nas criações intensivas, o aumento de doenças, em geral, tem sido associado com baixa qualidade da água, manejo inadequado e elevada densidade de estocagem dos peixes (Zanolo e Yamamura, 2006; Pavanelli et al., 2008; Araújo et al., 2009b, Onaka, 2009,

Madhuri et al., 2012b; Silva et al., 2013), fatores que facilitam a ocorrência de parasitos, aumentando a propagação das infecções.

Populações naturais de pirarucu têm sido parasitadas por espécies de Myxozoa, Monogenoidea, Nematoda, Cestoda, Digenea, Copepoda, Branchiura, Acanthocephala e Pentastomida (Thatcher, 2006; Gomes et al., 2006; Santos et al., 2008, Araújo et al., 2009b). Entretanto, a diversidade parasitária de pirarucu no cultivo é menor se comparada com a rica diversidade de populações naturais, embora tais estudos são ainda reduzidos. Segundo Gomes et al. (2006) essa riqueza parasitária em pirarucus de ambientes naturais pode estar associada ao hábito alimentar essencialmente piscívoro.

Em cultivo, entre os ectoparasitos de pirarucu, estão os monogenoideas *Dawestrema cycloancistrum* e *Dawestrema cycloancistrioides*, parasitos causadores de elevadas mortalidades nesses peixes durante as fases iniciais do cultivo (Delgado et al., 2007; Araújo et al., 2009 a,b; Marinho et al., 2013). Monogenoideas são helmintos na sua maioria ectoparasitos pertencentes ao filo Platyhelminthes, que se caracterizam pela presença do haptor, estrutura formada por uma série de ganchos, barras e âncoras, utilizadas para fixação no corpo dos hospedeiros (Thatcher, 2006; Pavanelli et al., 2008; Onaka, 2009; Eiras et al., 2010). Esses parasitos possuem forma alongada, ovoidal ou circular, alta especificidade parasitária, ciclo de vida direto, reproduzindo-se no próprio hospedeiro (Cavero e Fonseca, 2008), o que facilita a infestação em períodos curtos, em ambientes de aquicultura com elevada densidade de estocagem dos peixes. Em geral, são encontrados parasitando brânquias dos peixes, mas há espécies que podem parasitar a superfície do corpo e as cavidades nasais dos hospedeiros (Takemoto et al., 2004; Pavanelli et al., 2008).

Nas brânquias, os monogenoideas podem provocar graves alterações teciduais, incluindo inflamação, produção excessiva de muco e respiração acelerada, podendo levar os peixes à morte por asfixia (Pavanelli et al., 2008; Onaka, 2009; Eiras et al., 2010). No tegumento, geralmente causam lesões menos acentuadas, no entanto, facilitam a instalação de infecções secundárias causadas principalmente por bactérias oportunistas (Pavanelli et al., 2008).

Os parasitos geralmente podem comprometer o mecanismo de defesa dos peixes, causando epizootias em consequência de infecções parasitárias severas (Martins e Romero, 1996; Tavares-Dias et al., 2001a,b; Schalch e Moraes, 2005; Tavares-Dias et al., 2006; Chagas et al., 2007; Santos et al., 2013), assim diversos quimioterápicos

sintéticos vêm sendo utilizados na piscicultura para reduzir e controlar parasitoses, tais como formalina, cloreto de sódio, ácido acético, iodo, permanganato de potássio, sulfato de cobre, praziquantel, paration, levamisol, febendazole, entre outros, que na maioria podem ser tóxicos para os peixes, comprometendo principalmente as brânquias, o tegumento e o fígado, além de acumular resíduos na musculatura, oferecendo risco ao consumidor, e causar poluição ambiental (Tavares-Dias et al., 2011; Mouriño et al., 2012; Madhuri et al., 2012b).

Diante desses fatos supramencionados, o uso de plantas medicinais pode ser uma relevante alternativa profilática e terapêutica, embora ainda pouco usual na piscicultura (Chitmanat et al., 2005a,b; Pietro et al., 2005; Ravikumar et al., 2010; Harikrishnan et al., 2011, Madhuri et al., 2012 a,b,c; Pandey, 2013; Soares e Tavares-Dias, 2013), havendo então necessidades de estudos para as diversas espécies de plantas com potencial bioativo (Soares e Tavares-Dias, 2013).

1.3 Uso de plantas medicinais no tratamento de doenças em peixes

Plantas medicinais são aquelas com atividade biológica, contendo um ou mais substâncias ativas úteis à saúde humana (Baptista, 2007) ou animal, com potencial para produção de fármacos. Assim, no decorrer da história do homem é possível observar, desde tempos remotos, o uso de diversas plantas medicinais como remédio caseiro, para diversas finalidades. Atualmente, essa prática ainda persiste entre diversos povos do planeta, e o uso da fitoterapia tem sido apoiado pela Organização Mundial de Saúde (Maciel et al., 2002).

A utilização de plantas medicinais ou de suas substâncias majoritárias tem sido frequente no controle de doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e parasitos no homem (Soares e Tavares-Dias, 2013), bem como na medicina veterinária (Pietro et al., 2005; Soares e Tavares-Dias, 2013; Pandey, 2013), que tem por objetivo reduzir os problemas sanitários controlando as doenças que comprometem a produção e a produtividade dos animais (Niezen et al., 1996), especialmente daqueles de interesse zootécnico.

Atualmente, também é crescente o interesse sobre espécies de plantas medicinais e seus compostos majoritários, como alternativas ao uso de antibióticos e outros produtos químicos no combate de patógenos de peixes cultivados (Chitmanat et

al., 2005a,b; Pietro et al., 2005; Harikrishnan et al., 2011; Madhuri et al., 2012a; Ling et al., 2013; Pandey, 2013, Murthy e Kiran, 2013), bem como para promover crescimento e evitar estresse de manejo (Harikrishnan et al., 2011; Bulfon et al., 2013).

Tratamento com plantas medicinais para doenças parasitárias em peixes é uma alternativa potencialmente benéfica para a piscicultura, pois medicamentos fitoterápicos, em geral, são mais baratos e eficazes quando comparados aos agentes quimioterápicos sintéticos e podem melhorar as funções imunológicas não específicas dos peixes (Madhuri et al., 2012 b,c; Bulfon et al., 2013; Pandey, 2013; Murthy e Kiran, 2013). Assim, diversos estudos têm sido conduzidos com este intuito como, por exemplo, em juvenis de tilápia-do-nilo, extrato de *A. sativum* e *T. catappa* foram eficientes na eliminação de *Trichodina* sp. (Chitmanat et al., 2005b). Extrato de sementes de mamão *Carica papaya* foi eficaz no controle *in vitro* e *in vivo* de *I. multifiliis* em *Carassius auratus auratus* (Ekanem et al., 2004). Sementes de abóbora *Cucurbita maxima* eliminou 95,3% dos *Capillaria* e Anisakidae gen. sp. de *Astyanax zonatus*, enquanto sementes de mamão *Carica papaya* eliminou somente 72,0% dos monogenoideas das brânquias (Fujimoto et al., 2012). Extrato de *Psoralea corylifolia* mostrou atividade *in vitro* contra *I. multifiliis* de *Carassius auratus* (Ling et al., 2013). *Lates calcarifer* teve o crescimento, a sobrevivência, a resposta imune e a resistência a infecções bacteriana aumentada, quando alimentado com ração suplementada com *M. piperita* (Talpur, 2014).

1.4 *Mentha piperita* Linnaeus 1753 (Lamiaceae)

Dentre as plantas Lamiaceae destacam-se as do gênero *Mentha*, popularmente conhecidas no Brasil como mentas ou hortelãs, utilizadas para fins medicinais devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, espasmódicas, carminativas e antioxidantes (Stanisavljević et al., 2014), entre outras.

As propriedades bioativas das plantas aromáticas do gênero *Mentha* são parcialmente atribuídas aos óleos essenciais, que conforme a International Standard Organization (ISO) são definidos como produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (Simões e Spitzer, 1999). Quimicamente, os óleos

essenciais de *Mentha* sp. apresentam uma grande variabilidade, contudo são os monoterpenos (mentol, mentona, carvona, linalol e acetato de linalila) os componentes de maior valor econômico (Garlet et al., 2007; Santos et al., 2012; Deschamps et al., 2013). Bassolé et al. (2010) identificou no óleo essencial de *M. piperita* 17 constituintes químicos, os principais correspondem ao mentol (39,3%) e mentona (25,2%).

Mentha piperita, embora seja nativa da Europa, é cultivada em todo mundo, devido ao seu grande uso na alimentação, em produtos medicamentosos e em cosméticos (Iskan et al., 2002; Garlet et al., 2007). Tais interesses econômicos devem-se ao fato de que extrato e óleo essencial de *M. piperita* apresentam propriedades antimicrobianas contra várias cepas de bactérias, tais como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenos*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, entre outras (Iskan et al., 2002; Ydegarinia et al., 2006). E também por apresentar propriedades anti-inflamatórias, antiespasmódica, antiemética e analgésica (Iskan et al., 2002; Tampieri et al., 2005; Betoni et al., 2006).

A eficácia de *M. piperita* também foi descrita contra *Candida albicans* (Ahmad e Beg, 2001; Iskan et al., 2002; Sartoratto et al., 2004; Matos et al., 2009). Vidal et al. (2007) demonstram atividade anti-giardia, *in vitro* e *in vivo*, de extrato e frações de *M. piperita*. Extrato alcoólico e óleo de *M. piperita* possuem atividade anti-helmíntica (Girme et al., 2006; Nikesh et al., 2011; Maggiore et al., 2012). Todavia, não há estudos sobre a toxicidade do óleo essencial de *M. piperita* em organismos aquáticos e nem sobre sua ação no tratamento contra parasitos em peixes.

1.5 Toxicidade aguda em peixes

O combate dos parasitos que acometem os peixes em sistema de cultivo é feito tradicionalmente com aplicação de antibióticos e substâncias químicas, os quais têm sido amplamente criticados por seus impactos negativos, como o surgimento de organismos resistentes e o alto poder residual, podendo contaminar os peixes, o homem e o meio ambiente (FAO, 2010; Figueiredo, 2011; Mouriño et al., 2012; Madhuri et al., 2012b). Assim, diversos produtos naturais vêm sendo usados como agentes antiparasitários na piscicultura, em substituição aos produtos químicos sintéticos (Madhuri et al., 2012 a,b; Soares e Tavares-Dias, 2013; Pandey, 2013), pois geralmente

causam menor resistência, apresentam baixa toxicidade, são facilmente biodegradáveis e inócuos ao ambiente (Maximiano et al., 2005). No entanto, para que plantas medicinais e seus derivados possam ser utilizados com finalidades terapêuticas, testes de toxicidade devem ser realizados para determinar as concentrações clínicas seguras para cada espécie de peixe (Grisolia, 2005).

Os efeitos dos produtos naturais sobre os organismos aquáticos podem ser estimados e monitorados por testes de toxicidade aguda, uma vez que simulam em laboratório uma situação ambiental na qual o organismo alvo é exposto, durante curto ou longo período de tempo, à concentrações elevadas de um agente. Em geral, durante esses testes, são avaliados nos organismos alterações comportamentais, fisiológicas, bioquímicas, histológicas e/ou genotóxicos (Ferreira, 2004).

O uso de testes de toxicidade para peixes surgiu na Grã-Bretanha, nas décadas de 20 e 30, mas só foram padronizados dentro de metodologias em toxicologia aquática na década de 60 (Machado, 1999). Nas últimas décadas esses testes vêm sendo utilizados em condições laboratoriais e de campo, por serem capazes de detectar integralmente todas as intervenções e perturbações diretas e indiretas causadas por substâncias nocivas aos organismos, mostrando ser uma ferramenta eficiente no monitoramento da qualidade ambiental e na identificação de condições estressantes para os peixes frente à exposição de produtos potencialmente tóxicos (Affonso et al., 2009; Maciel, 2009; Tavares-Dias et al., 2011).

As brânquias dos peixes são órgãos vitais, uma vez que desempenham numerosas funções, tais como respiração, osmorregulação, excreção de produtos nitrogenados e regulação do equilíbrio ácido-base (Camargo et al., 2007; Cinar et al., 2009). Em razão dessas multifuncionalidades e por apresentarem extensa área em contato com meio aquático, as brânquias estão mais sensíveis à presença de contaminantes, os quais podem causar danos à sua estrutura e função (Romão et al., 2006), uma vez que podem ser um local de depuração de contaminantes ambientais (Meletti et al., 2003). Portanto, alterações teciduais nas brânquias são reconhecidas como um método rápido e válido para determinar danos causados aos peixes quando expostos a diferentes agentes contaminantes (Flores-Lopes e Malabara, 2007; Fiuza et al. 2011) ou não contaminantes. Entre as principais alterações teciduais nas brânquias estão à relativa abundância e mudança morfológica das células de cloreto, hiperplasia das células epiteliais e fusão das lamelas secundárias (Motter et al., 2004). Assim, este estudo contribui com o conhecimento sobre efeitos do óleo de *M. piperita* em pirarucus.

2 PROBLEMA

No cultivo de *A. gigas* é frequente as infecções branquiais causadas por monogenoideas *Dawestrema* spp. e, em geral, os tratamentos são feitos usando substâncias químicas, que são tóxicas para os peixes e nem sempre eliminam esses parasitos. Como a utilização de produtos naturais pode ser uma alternativa ao uso de produtos químicos, o óleo essencial de *M. piperita* pode ter ação antiparasitária sem ser tóxico para *A. gigas*?

3 HIPÓTESES

- Óleo essencial de *M. piperita* tem eficácia *in vitro*, na eliminação de *Dawestrema cycloancistrum* e *Dawestrema cycloancistrioides* das brânquias de *A. gigas*, devido à sua ação anti-helmíntica.
- Óleo essencial de *M. piperita* não causa alterações histológicas nas brânquias de *A. gigas*, uma vez que é um produto natural e pode ter baixo efeito tóxico.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar a ação antiparasitária de diferentes concentrações do óleo essencial de *M. piperita* para *Dawestrema* spp. e os efeitos tóxicos desse óleo em *A. gigas*.

4.2 Específicos

- Testar, *in vitro*, diferentes concentrações do óleo essencial de *M. piperita* com eficácia contra *Dawestrema* spp. das brânquias de *A. gigas*;
- Determinar a concentração letal (CL_{-50-4h}) do óleo essencial de *M. piperita* para *A. gigas*;
- Avaliar os possíveis efeitos tóxicos das diferentes concentrações do óleo essencial de *M. piperita* na estrutura morfológica das brânquias de *A. gigas*.

5 REFERÊNCIAS

- Affonso EG, Barros FP, Brasil EM, Tavares-Dias M, Ono EA. Indicadores fisiológicos de estresse em peixes expostos ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂). In: Tavares-Dias M (Org.). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. 2009; Macapá: Embrapa Amapá. 346-360.
- Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens, J. Ethnopharmacol. 2001; 74: 113-123.
- Allan JD, Abell R, Hogan Z, Revenga C, Taylor BW.; Welcomme RL, et al. Overfishing of inland waters. BioScience. 2005; 55(12): 1041-1051.
- Andrade JIA, Ono EA, Menezes GC, Brasil EM, Roubach R, Urbinati EC, et al. Influence of diets supplemented with vitamin C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. Comp. Biochem. Physiol. Part A. 2007; 146A(4): 576-580.
- Araújo CSO, Tavares-Dias M, Gomes AL, Andrade SMS, Lemos JRG, Oliveira AT, et al. Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil. In: Tavares-Dias M, organizador. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá; 2009a. p. 389-424.
- Araújo CSO, Gomes AL, Tavares-Dias M, Andrade SMS, Belem-Costa A, Borges JT, et al. Parasitic infections in pirarucu fry, *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) kept in a semi-intensive fish farm in Central Amazon, Brazil. Vet. Arhiv. 2009b; 79(5): 499-507.
- Azevedo TMP, Martins ML, Bozzo FR, Moraes FR. Haematological and gills response in parasitized tilapia from valley of Tijucas river, SC, Brazil. Sci.Agric. 2006; 63:115-120.
- Baptista ER. Conhecimentos e práticas de cura em comunidades rurais amazônicas: recursos terapêuticos vegetais [tese]. Belém: Núcleo de Altos Estudos Amazônicos, Universidade Federal do Pará; 2007.
- Bassolé IHN, Lamien-Meda A, Bayala B, Tirogo S, Franz C, Novak J, et al. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. Molecules, 2010; 15: 7825-7839.
- Betoni JEC, Mantovani RP, Barbosa LN, Distasi LC, Fernandes-Junior AF. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. Mem. Int. Osvaldo Cruz. 2006; 101(4): 387-390.
- Brandão FR, Carvalho ES, Gomes LC, Crescêncio R. Uso de sal durante o transporte de juvenis (1kg) de pirarucu (*Arapaima gigas*). Acta Amaz. 2008; 38(4): 767-772.

- Brandão FR, Gomes LC, Chagas EC. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amaz.* 2006; 36(3): 349-356.
- Bulfon C, Volpatti D, Galeotti M. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquacul. Res.* 2013; 1-39.
- Camargo SGO, Pouey JLOF. Aquicultura - um mercado e expansão. *Rev. Bras. Agrocienc.* 2005; 11(4): 393-396.
- Camargo MMP, Martinez CBR. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.* 2007; 5: 327-336.
- Castello L, Stewart DJ. Assessing CITES non-detriment finding procedures for *Arapaima gigas* in Brazil. *J. Appl. Ichthyol.* 2010; 26: 49-56.
- Castello L. Lateral migration of *Arapaima gigas* in floodplains of the Amazon. *Ecol. Freshw. Fish.* 2008; 17(1): 38-46.
- Cavero BAS, Fonseca FAL. Pirarucu: situação atual e perspectivas na região amazônica. *Pan. Aquicultura.* 2008; 18(110): 33-49.
- Cavero BAS, Pereira-Filho M, Roubach R, Ituassú DR, Granda AL, Crescêncio R. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu em ambiente confinado. *Pesqui. Agropec. Bras.* 2003a; 38(1): 103-107.
- Cavero BAS, Crescêncio R, Ituassú DR, Pereira-Filho M, Roubach R. Controle da taxa de mortalidade de pirarucu, *Arapaima gigas*, naturalmente parasitado por *Dawestrema* sp. (Monogenea: Dactilogyridae). In: *Anais do XII Simpósio Brasileiro de Aquicultura.* 2003b; 2: 107-115.
- Cavero BAS. Densidade de estocagem de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829) em tanque-rede de pequeno volume [dissertação]. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Fundação Universidade do Amazonas; 2002.
- Chagas EC, Gomes LC, Junior HM, Roubach R. Produtividade de tambaqui criado em tanque-rede com diferentes taxas de alimentação. *Cienc. Rural.* 2007; 37(4): 1109-1115.
- Chagas ACS. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2004; 13(1): 156:160.
- Chitmanat C, Tongdonmuan K, Khanom P, Pachontis P, Nunsong W. Antiparasitic, antibacterial, and antifungal activities derived from a *Terminalia catappa* Linn solution against some tilapia (*Oreochromis niloticus*) pathogens. *Acta Hort.* 2005a; 678: 179-182.
- Chitmanat C, Tongdonmuan K, Nunsong W. The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Songklanakarin J. Sci. and Technol.* 2005b; 27(Suppl.1): 359-364.

Cinar K, Aksoy A, Emre Y, Asti RN. The histology and histochemical aspects of gills of the flower fish, *Pseudophoxinus antalyae*. Vet Res Commun. 2009; 33:453-460.

Claudiano GS, Dias Neto J, Sakabe R, Cruz C, Salvador R, Pilarski F. Eficácia do extrato aquoso de *Terminalia catappa* em juvenis de tambaqui parasitados por monogenéticos e protozoários. Rev. Bras. Saúde Prod. An. 2009; 10(3): 625-636.

Cruz C, Machado Neto JG, Yudi Fujimoto R, Henares MNP, Duó DA. Eficácia do paration metílico e do extrato aquoso de folhas secas de nim no controle de *Anacanthorus penilabiatus* (monogenoidea) em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Bol. Inst. Pesca. 2008; 34 (1): 61-69.

Delgado PM, Chu-Koo FW, Malta JCO, Gomes, ALS, Varella AMB, Martin ST. Fauna ectoparasitaria em alevinos de paiche *Arapaima gigas* (SCHINZ, 1822) cultivados em el cantro de investigaciones de Quistococha, Loreto, Perú. Fol. Amazon. 2007; 16(1-2): 23-27.

Deschamps C, Monteiro R, Machado M P, Scheer AP, Cocco L, Yamamoto C. Avaliação de genótipos de *Mentha arvensis*, *Mentha x piperita* e *Mentha* spp. para produção de mentol. Hortic. Bras. 2013; 31(2): 178-183.

Diab AS, Aly SM, John G, Abde-Hadi Y, Mohammed MF. Effect of garlic, black seed and biogen as immunostimulants on the growth and survival of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae), and their response to artificial infection with *Pseudomonas fluorescens*. Afr. J. Aquatic Sci. 2008; 33(1): 63-68.

Drumond GVF, Caixeiro APA, Tavares-Dias M, Marcon JL, Affonso EG. Características bioquímicas e hematológicas do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) de cultivo semi-intensivo na Amazônia. Acta Amaz. 2010; 40(3): 591-596.

Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. Phytother Res. 2006; 20: 1-16.

Eiras JC, Takemoto RM, Pavanelli GC. Diversidade dos parasitos de peixes de água doce do Brasil. Maringá: Clichetec, 2010. 333p.

Ekanem AP, Obiekezie A, Kloas W, Knopf K. Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitol. Res. 2004; 92: 361-366.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations The State of World Fisheries and Aquaculture. Public health risks from the use of veterinary medicinal products. Rome. 2010. 197p.

Ferreira, CM. Análises complementares obtidas a partir de testes de toxicidade aquática. In: Ranzani-Paiva MJ, Takemoto RM, Peres Lizama MA. Sanidade de organismos aquáticos. 2004. São Paulo: Varela. P. 273-284.

Figueiredo HCP. O uso de fitoterápicos na aquicultura. *Revista Panorama da Aquicultura*. 2011. 124: 20-25.

Fiuza TS, Silva PC, Paula JR, Tresvenzol LMF, Souto MED, Sabóia-Morais SMT. Análise tecidual e celular das brânquias de *Oreochromis niloticus* L. tratadas com extrato etanólico bruto e frações das folhas da pitanga (*Eugenia uniflora* L.) – Myrtaceae. *Ver, Bras. Pl. Med.* 2011; 13(4): 389-395.

Flores-Lopes F, Malabara LR. Alguns aspectos da assembleia de peixes utilizados em programas de monitoramento ambiental. *Vitalle*. 2007; 19(1): 45-58.

Fujimoto RY, Costa HC, Ramos FM. Controle alternativo de helmintos de *Astyanax cf. zonatus* utilizando fitoterapia com sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) e mamão (*Carica papaya*). *Pesq. Vet. Bras.* 2012; 32(1): 5-10.

Garlet TMB, Santos OS, Medeiros SLP, Manfron PA, Garcia DC, Borcioni E, et al. Produção e qualidade do óleo essencial de menta em hidroponia com doses de potássio. *Cien. Rural*. 2007; 37(4): 956-962.

Girme AS, Bhalke RD, Ghogare PB, Tambe VD, Jadhav RS, Nirmal SA. Comparative *in vitro* anthelmintic activity of *Mentha piperita* and *Lantana camara* from western India. *J. Pharm. Sci.* 2006; 5(1-2): 5-7.

Gomes AL, Santos MS, Costa AB, Correa MV, Varella AB. Riqueza de helmintos parasitos do estômago de pirarucu *Arapaima gigas* (Shinz, 1822) coletados na reserva de desenvolvimento sustentável de Mamirauá, Tefé, Amazonas (Brasil). In: IV Congresso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 2006 (www.revistaaquatic.com/civa2006): 891-895.

Grisolia, CK. Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. Editora Universidade de Brasília. 2005. 392 p.

Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquacult.* 2011; 317(1-4): 1-15.

Iscan G, Kirimer N, Kurkcuoglu M, Baser KHC, Demirci F. Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 3943-3946.

Ituassú DR. Exigência proteica de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829) [dissertação]. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Fundação Universidade do Amazonas; 2002.

John G, Mesalhy S, Rezk M, Elnaggar G, Fathi, M. Effect of some immunostimulants as feed additives on the survival and growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and their response to artificial infection. *Egypt J. Aquat. Biol. Fish.* 2007; 11(3): 1299-1308.

Leung TLF, Bates AE. More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: implications for food security. *J. Appl. Ecol.* 2012; 50: 215-222.

Ling F, Lu C, Tu X, Yi Y, Huang A, Zhang Q, et al. Antiprotozoal screening of traditional medicinal plants: evaluation of crude extract of *Psoralea corylifolia* against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish. *Parasitol. Res.* 2013. Doi:10.1007/s00436-013-3397-0.

Machado MR. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. *Unopar Cient. Cienc. Biol. Saude.* 1999; 1(1): 63-76.

Maciel PO. Efeito do praziquantel sobre as variáveis sanguíneas de *Colossoma macropomum* Curvier, 1818 (Characidae: Serrasalminae) e sua eficiência como anti-helmíntico no controle de parasitas monogenóides (plathyhelminthes: monogenoidea). [dissertação]. Manaus/Amazonas: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas. 2009.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga VF, Grynberg NF, Echevarria A. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. *Quim. Nova.* 2002; 25(3): 429-438.

Madhuri S, Mandloi AK, Pandey G, Sahni YP. Antimicrobial activity of some medicinal plants against fish pathogens. *Int. Res. J. Pharm.* 2012a; 3(4): 28-30.

Madhuri S, Shrivastav AB, Sahni YP, Pandey G. Overviews of the treatment and control of common fish diseases. *Int. Res. J. Pharm.* 2012b; 3(7): 123-127.

Madhuri S, Sahni YP, Pandey G. Herbal feed supplement as drugs and growth promoter to fishes. *Int. Res. J. Pharm.* 2012c; 3(9): 30-33.

Maggiore MA, Albanese AA, Gende LB, Eguaras MJ, Denegri GM, Elissondo MC. Anthelmintic effect of *Mentha* spp. essential oils on *Echinococcus granulosus* protoscoleces and metacestodes. *Parasitol. Res.* v.110, 2012; 110(3): 1103-1112.

Marinho RGB, Tavares-Dias M, Dias-Grigório MKR, Neves LR, Yoshioka ETO, Boijink CL, et al. Helminthes and protozoan of farmed pirarucu (*Arapaima gigas*) in eastern Amazon and host-parasite relationship. *Arq. Bra. Med. Vet. Zootc.* 2013; 65(4): 1192-1202.

Martins ML, Romero NG. Efectos del parasitismo sobre El tijido branquial em peces cultivados: Estudio parasitológico e histopatológico. *Ver. Bra. Zool.* 1996; 13: 489-500.

Martins ML, Tavares-Dias M, Fujimoto RY, Onaka EM, Nomura DT. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. *Arq. Bras. Med.Vet. Zoot.* 2004; 56(5): 640-646.

Matthiensen A, Chagas EA, Duarte OR, Kaminski PE, Albuquerque TCS. Compatibilização de demanda para o uso das águas no Estado de Roraima: Piscicultura. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2009. 24p.

Matos BM, Komiyama EY, Balducci I, Koga-Ito CY. Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita* sobre *Candida albicans* e *C.tropicalis*. Ver. Odontol. UNESP. 2009; 3(4): 244-248.

Maximiano AA, Fernandes RO, Nunes FP, Assis MP, Matos R.V, Barbosa CGS, et al. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. Ciênc. Saúde Colet. 2005; 10: 483-491.

Mckay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). Phytother. Res. 2006; 20: 619-633.

Meletti PC, Rocha O, Martinez CBR. Avaliação da degradação ambiental na Bacia do Rio Mogi-Guaçu por meio de teste de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: Brigante J, Espíndola ELG (Org.). Limnologia fluvial – Um estudo no Rio Mogi-Guaçu. 2003. São Carlos, p.149-180.

Mesalhy S, John G, El-Naggar G, Fathi M. Effect of Echinacea on body gain, survival and some hematological and immunological parameters of *Oreochromis niloticus* and their response to challenge infection. Egypt J. Aquatic Biol. Fish.2007; 11(3): 435-445.

Metwally MAA. Effects of garlic (*Allium sativum*) on some antioxidant activities in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). World J. Fish & Marine Sci. 2009; 1(1): 56-64.

Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA, Boletim estatístico da pesca e aquicultura, Brasília (DF) 2011, 2013; p.60.

Motter, MDS, Silva LD, Oliveira RB, Yamada, AT, Santos SC, Sabóia-Morais SMT. Índice mitótico em células epiteliais da brânquia de Guaru (*Poecilia vivipara*) tratados com frações da casca do caule e da folha de pequi (*Caryocar brasiliensis*). Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. [online]. 2004; 41(4): 221-227.

Mouriño JLP, Jatobá A, Silva BC, Vieira FN, Martins ML. Probióticos na aquicultura. In: Silva-Sousa AT, Lizama MLAP, Takemoto RM. Patologia e sanidade de organismos aquáticos. Abrapoa, Maringá, 2012; 381-404.

Murthy KS, Kiran BR. Review on usage of medicinal plants in fish diseases. Int. J. Pharm. Bio Sci. 2013; 4(3): (B) 975-986.

Niezen JH, Charleston WAG, Hodgson J, Mackay AD, Leathwick DM. Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics: approaches, experiences and prospects. Int. J. Parasitol. 1996; 26(8-9): 983-992.

Nikesh M, Binitha G, Rekha S, Ravindra N, Anto Shering M. Comparative *in vitro* anthelmintic activity of chloroform and cetone extracts of *mentha piperita*. Intern. J. Pharm. Biol. 2011; 2(3): 945-948.

Núñez J, Chu-Koo F, Berland M, Arévalo L, Ribeyro O, Duponchelly F, et al. Reproductive success and fry production of the paiche or pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz), in the region of Iquitos, Peru. Aquacult. Res. 2011; 42: 815-820.

Nya EJ; Austin B. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 2009; 32: 963-970.

Onaka EM. Principais parasitoses em peixes de água doce no Brasil. In: Tavares-Dias M. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Embrapa - Amapá, Macapá; 2009. p. 526 - 574.

Ono EA, Nunes ESS, Cedano JCC, Filho MP, Roubach R. Digestibilidade aparente de dietas práticas com diferentes relações e energia: proteína em juvenis de pirarucu. Pesq. Agropec. Bras. 2008; 43(2): 249-254.

Ono EA. Criação de peixes em tanques-rede. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, Zootec-2005, Anais...Campo Grande, 2005; p.1-14.

Ono EA, Halverson MR, Kubitza F. Pirarucu - O gigante esquecido. Panorama Aquicul. 2004; 14: 14-25.

Ono EA, Roubach R, Pereira MF. Pirarucu production - advances in central Amazon, Brazil Glob. Aquacul. Adv. 2003; 6: 44-46.

Ono EA, Kubitza F. Cultivo de peixes em tanques-rede. 2ª Ed. Jundiaí: F. Kubitza; 1999.

Pandey G. Some medicinal plants to treat fish ectoparasitic infections. Int. J. Pharm. Reas Sci. 2013; 2(2): 532-538.

Pavanelli GC, Eiras JC, Takemoto RM. Doenças de peixe: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 3º ed. Maringá: Eduem; 2008; 311p.

Peixoto ITA, Furlanetti VF, Anibal PC, Duarte MCT, Höfling JF. Potential pharmacological and toxicological basis of the essential oil from *Mentha* spp. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. 2009; 30(3): 235-239.

Pereira-Filho M, Roubach R. Pirarucu, *Arapaima gigas*. In: Baldisserotto B, Gomes LC, organizadores. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: Editora UFSM; 2010. p. 27-56.

Pietro A, Ocampo AA, Fernandez A, Perez, MB. El empleo de medicina natural em el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso em Cuba y México. Rev. Esp. Cien Quím. Biol. 2005; 8(1): 38-49.

Portes-Santos CP, Moravec F, Venturieri R. Capillostrongyloides arapaimae sp. n. (Nematoda: Capillariidae), a new intestinal parasite of the arapaima *Arapaima gigas* from the Brazilian Amazon. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2008; 103:392-395.

Queiroz JF, Lourenço JNP, Kitamura PC, Scorvo-Filho JD, Curino JEP, Castagnolli N, et al. Aquaculture in Brazil: Research priorities and potential for further international cooperation. Aquaculture. 2004; 35: 45-50.

Ravikumar S, Selvan GP, Gracelin AAN. Antimicrobial activity of medicinal plants along Kanyakumari coast, Tamil Nadu, India. *African J. Basic Appl. Sci.* 2010; 2(5-6): 153-157.

Rocha CMC, Resende EK, Routledge EAB, Lundstedt LM. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. *Pesq. Agropec. Bras.* 2013; 48(8): 4-6.

Romão S, Donatti L, Freitas MO, Teixeira J, Kusma J. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 2006; 49(3): 441-448.

Sahu S, Das BK, Mishra BK, Pradhan J, Sarangi N. Effects *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Ichthyol.* 2007; 23:80-86.

Santos EF, Tavares-Dias M, Pinheiro DA, Neves LR, Marinho RGB, Dias MKR. Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanque-rede no estado do Amapá, Amazônia Oriental. *Acta Amaz.* 2013; 43(1): 105-111.

Santos VMCS, Pinto MAS, Bizzo H, Deschamps C. Seasonal variation of vegetative growth, essential oil yield and composition of menthol mint genotypes at southern Brazil. *Biosci. J.* 2012; 28(5): 790-798.

Santos SMC, Ceccarelli OS, Luque JL. Helminthos parasitos do pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae), no Rio Araguaia, Estado de Mato Grosso, Brasil. *Ver. Bra. Parasitol. Vet.* 2008; 17(3): 171-173.

Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira MG, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. of Microbiol.* 2004; 35(4): 275-280.

Schalch SHC, Moraes FR. Distribuição sazonal de parasitos branquiais em diferentes espécies de peixes em pesque-pague do município de Guariba-São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2005; 14(4): 141-146.

Shalaby AM, Khattab YA, Abdel Rahman AM. Effects of garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Venom. Toxins incl. Trop. Dis.* 2006; 12(2): 172-201.

Silva RM, Tavares-Dias M, Dias MWR, Dias MKR, Marinho RGB. Parasitic fauna in hybrid tambacu from fish farms. *Pesq. Agropec. Bras.* 2013; 48(8): 1049-1057.

Simões CM, Spitzer V. Óleos essenciais. In: Simões CMO, Schenckel, EP, Gosmann, G, Mello, JCP. *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 1999. p. 387-415.

Soares BV, Tavares-Dias M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amaz.* 2013; 3(1): 109-123.

Stanislavljević D, Đorđević S, Milenković M, Lazić M, Veličković D, Randelović N, et al. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oils obtained from *Mentha*

longifolia L. Hudson, dried by three different techniques. Rec. Nat. Prod. 2014; 8(1): 61-65.

Takemoto RM, Lizama MAP, Guidelli GM. Parasitos de peixes de águas continentais. In: Ranzani-Paiva MJT, Takemoto RM, Lizama MAP. Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Ed. Varela; 2004. p. 179-197.

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

Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F, Carelle MS, Falcione L, Cioni PL, et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. Mycopathologia. 2005; 159: 339-345.

Tavares-Dias M, Ferreira JS, Affonso EG, Ono EA, Martins ML. Toxicity and effects of copper sulfate on parasitic control and hematological response of tambaqui *Colossoma macropomum*. Bol. Inst. Pesca. 2011; 37(4): 355-365.

Tavares-Dias M, Lemos JRG, Andrade SMS, Pereira SLA. Ocorrência de ectoparasitos em *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characidae) cultivados em estação de piscicultura na Amazônia Central. In: IV Congresso Ibero americano Virtual de Acuicultura. CIVA 2006 (www.revistaaquatic.com/civa2006): 726-731.

Tavares-Dias M, Martins ML, Moraes FR. Fauna parasitária de peixes oriundos de pesque-pague do município de Franca, São Paulo, Brasil. I. Protozoários. Rev. Bras. Zool. 2001a; 18(supl.1): 67-79.

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. 2001b; 18(supl.1): 81-95.

Tavechio WLG, Guidelli G, Portz L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em pisciculturas. B. Inst. Pesca. 2009; 35 (2): 335-341.

Thatcher VE. Amazon fish parasites. Sofia-Moscow: Pensoft, 2006. 508 p.

Vidal F, Vidal JC, Gadelha APR, Lopes CS, Coelho MGP, Monteiro-Leal LH. Giardia lamblia: The effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) ontrophozoites. Exp. Parasitol. 2007; 115: 25-31.

Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. Phytochem. 2006; 67: 1249-1255.

Zanolo R, Yamamura MH. Parasitas em tílapias-do-nilo criadas em sistema de tanques-rede. Cienc Agr. 2006; 27(2): 281-288.

CAPÍTULO 1

Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Mentha piperita* (Lamiaceae) em *Dawestrema* spp. (Monogenoidea) e toxicidade aguda em *Arapaima gigas* (Arapaimidae)

Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Mentha piperita* (Lamiaceae) em *Dawestrema* spp. (Monogenoidea) e toxicidade aguda em *Arapaima gigas* (Arapaimidae)

Dayna Filocreão MALHEIROS¹, Patrícia Oliveira MACIEL², Marcela Nunes VIDEIRA³, Marcos TAVARES-DIAS^{1,4*}

¹Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO), Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). Rodovia Juscelino Kubitschek km 2, CEP: 68902-280, Macapá, AP, Brasil.

²Embrapa Aquicultura e Pesca (CNPASA). Quadra 104 Sul, Av. LO 1, 34, Conjunto 4, CEP 77020-020, Palmas, TO, Brasil.

³Universidade do Estado do Amapá (UEAP). Avenida Presidente Vargas, 650, Centro CEP: CEP 68.900-070, Macapá, AP, Brasil.

⁴Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, Embrapa Amapá. Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, 2600, CEP: 68903-419, Macapá-AP, Brasil.

* Autor correspondente: marcos.tavares@embrapa.br

RESUMO

Este estudo avaliou o efeito *in vitro* do óleo essencial de *Mentha piperita* L. sobre monogenoideas e sua ação tóxica para *Arapaima gigas*. Para o ensaio *in vitro* brânquias de *A. gigas* naturalmente infectadas por *Dawestrema cycloancistrum* e *Dawestrema cycloancistrioides* foram expostas a 0, 80, 160 e 320 mg/L de óleo essencial de *M. piperita*, que mostraram ter atividade anti-helmíntica. No teste de toxicidade, os alevinos de *A. gigas* foram expostos a 0, 20, 40, 80, 100, 130, 160 mg/L de óleo essencial de *M. piperita* para determinação da concentração letal (CL_{50-4h}) que foi 38 mg/L. As brânquias dos peixes que participaram do teste de toxicidade foram usadas para análises histológicas e as principais alterações teciduais encontradas após 4 horas de exposição a 80, 100, 130 e 160 mg/L de óleo essencial de *M. piperita* foram elevações epiteliais, fusão das lamelas secundárias, hipertrofia, aneurisma e necrose. Os resultados *in vitro* mostraram que a atividade anti-helmíntica do óleo essencial de *M. piperita* contra *Dawestrema* spp. foi dose dependente. Para *A. gigas*, somente concentrações em torno de 20 mg/L de óleo essencial de *M. piperita* podem ser usadas sem que ocorra mortalidade dos peixes e alterações teciduais nas brânquias.

Palavras chaves: Produto Natural, Histologia, Monogenoidea, Toxicidade.

In vitro effect of the essential oil of *Mentha piperita* (Lamiaceae) in *Dawestrema* spp. (Monogenoidea) and acute toxicity in *Arapaima gigas* (Arapaimidae)

ABSTRACT

This study evaluated the *in vitro* effect of the essential oil of *Mentha piperita* L. on monogenoideas and its toxic action to *Arapaima gigas*. For the *in vitro* assay, *A. gigas* gills naturally infected by *Dawestrema cycloancistrum* and *Dawestrema cycloancistrioides* were exposed to 0, 80, 160 and 320 mg/L of the essential oil of *M. piperita*, which proved to have anthelmintic activity. In toxicity tests, *A. gigas* fingerlings were exposed to 0, 20, 40, 80, 100, 130, 160 mg/L of the essential oil of *M. piperita* for determination of the lethal concentration (CL_{50-4h}), which was 38 mg/L. The gills of the fish who participated in the toxicity test were used for histological analyzes and major changes found after 4 hours of exposure to 80, 100, 130 and 160 mg/L essential oil of *Mentha piperita* were epithelial uplifting, fusion of the secondary lamellae, hypertrophy, aneurysm and necrosis. The *in vitro* results showed that the anthelmintic activity of the essential oil of *M. piperita* against *Dawestrema* spp. was dose dependent. For *A. gigas*, only low concentrations of the essential oil of *M. piperita* (approximately 20 mg/L) can be used without cause mortality of fish and gills tissue changes.

Key words: Natural product, Histology, Monogenoidea, Toxicity.

INTRODUÇÃO

Arapaima gigas Schinz, 1822 é um peixe da família Arapaimidae endêmico da região amazônica que está entre os maiores peixes de escamas de água doce, podendo alcançar 3 m de comprimento e 200 kg (Araújo et al., 2009; Nuñez et al. 2011; Marinho et al. 2013). Esse peixe destaca-se entre as espécies nativas da Amazônia, por apresentar excelentes características biológicas e zootécnicas, tais como rápido crescimento, respiração aérea, carne branca, magra e livre de espinhas intramusculares, fácil adaptação ao alimento artificial, tolerância ao adensamento e manuseio, além do seu elevado valor comercial (Ono et al. 2008; Nuñez et al. 2011; Marinho et al. 2013).

O cultivo intensivo de *A. gigas* tem se intensificado, apesar de alguns entraves impedirem a sua produção em larga escala, entre esses se destacam as doenças, que nos primeiros estágios de vida ocasionam grandes perdas durante a larvicultura e recria (Delgado et al. 2007; Marinho et al. 2013). Monogenoidea *Dawestrema cycloancistrum* Price e Nowlin, 1967 e *Dawestrema cycloancistrioides* Kritsky, Boeger e Thatcher 1985 estão entre os parasitos que causam doenças em *A. gigas* (Delgado et al. 2007; Araújo et al. 2009; Marinho et al. 2013). Na piscicultura, o tratamento de parasitoses é complexo e, em geral, pouco eficiente.

Diversos quimioterápicos (por exemplo, cloreto de sódio, praziquantel, levamisol, formalina, mebendazol, sulfato de cobre, entre outros) têm sido usados no controle de monogenoideas de peixes (Fujimoto et al. 2006; Chagas et al. 2006; Tavares-Dias et al. 2011; Chagas et al. 2012). Porém, a maioria desses produtos além de ser tóxicos para os peixes; comprometendo principalmente as suas brânquias, tegumento e fígado (Tavares-Dias et al. 2011; Tu et al. 2013), são potenciais poluentes ao meio aquático e podem causar sérios riscos a saúde dos consumidores (Maximiano et al. 2005; Tavechio et al. 2009).

Na piscicultura, uma alternativa que tem se mostrado promissora para controle e prevenção de doenças em peixes é o uso de plantas medicinais. Atualmente, vem crescendo o interesse por plantas com atividade bioativa, em substituição ao uso de produtos químicos para o combate de patógenos de peixes (Harikrishnan et al. 2011; Pandey 2013, Murthy e Kiran 2013; Tu et al. 2013). Porém, para que plantas medicinais ou seus derivados sejam utilizados no tratamento de doenças em peixes com segurança na piscicultura, testes de toxicidade devem ser previamente conduzidos, para estabelecer a tolerância para cada espécie de peixe.

A natureza pode fornecer uma gama de compostos fitoquímicos ainda pouco estudados, como os da *Mentha piperita* L. (hortelã-pimenta). *Mentha piperita* é uma Lamiaceae aromática conhecida da indústria farmacêutica, medicina e culinária (Mckay e Blumberg 2006; Garlet *et al.* 2007; Maggiore *et al.* 2012). O óleo essencial da *M. piperita* contém uma grande variabilidade fitoquímica, sendo mentol e mentona, os componentes majoritários e de maior interesse econômico (Garlet *et al.* 2007; Peixoto *et al.* 2009; Maggiore *et al.* 2012; Samber *et al.* 2014). Tais interesses econômicos devem-se ao fato do extrato e óleo essencial de *M. piperita* apresentar propriedades antissépticas, antiespasmódicas, analgésicas, anti-inflamatórias, carminativas, antifúngicas, antibacterianas, antiprotozoárias e anti-helmínticas (Yadegarinia *et al.* 2006; Almeida *et al.* 2007; Nikesh *et al.* 2011; Maggiore *et al.* 2012). Além disso, há uma preocupação em utilizar substâncias antiparasitárias que reduzam a contaminação do ambiente e que não deixem resíduos tóxicos na carne do peixe destinada ao consumo humano (Tavechio *et al.* 2009; Murthy e Kiran 2013; Zhang *et al.* 2014). Assim, *M. piperita* vem sendo usada no controle de helmintos intestinais de mamíferos (Almeida *et al.* 2007), mas ainda não está sendo usada para peixes. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos *in vitro* do óleo essencial de *M. piperita* contra *Dawestrema* spp. e a toxicidade aguda em *Arapaima gigas*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do óleo essencial de *Mentha piperita*

Para a extração do óleo essencial utilizou-se folhas e inflorescências de *M. piperita* cultivada e processada no Setor de Plantas Medicinais e Hortaliças da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus (estado do Amazonas, Brasil). Após o corte das plantas no campo, as partes aéreas (folhas e/ou inflorescências) foram retiradas para a extração do óleo essencial e, posteriormente uma alíquota do óleo extraído foi submetida à análise química por cromatografia gasosa com espectrometria de massas (Morais *et al.* 2012). O óleo essencial de *M. piperita* apresentou os seguintes componentes químicos: alfa-pineno (1,1%), beta-pineno (1,9%), mirceno (1,1%), p-cimeno (4,6%), limoneno (3,1%), mentona (18,2%), iso-mentona (13,4%), mentol (30,8%), 4-terpineol (1,5%), pulegona (13,7%), acetato de mentila (9,7%).

Peixes e aclimação

Alevinos de pirarucu (*Arapaima gigas*) foram adquiridos de piscicultura comercial e transportados para o Laboratório de Aquicultura e Pesca da Embrapa Amapá (Macapá/AP). Durante 20 dias, estes peixes foram aclimatados em um tanque de polietileno com capacidade para 1.000 L, com aeração constante e fluxo contínuo de água, com temperatura média de $29,4 \pm 0,3$ °C, oxigênio dissolvido $8,0 \pm 0,4$ mg/L, pH $5,3 \pm 0,3$, amônia total de $0,10 \pm 0,08$ mg/L, alcalinidade média de $11,7 \pm 3,9$ mg CaCO₃/L, dureza média de $10,0 \pm 0$ mg CaCO₃/L e condutividade média de $0,03 \pm 0,0008$ µS/cm³. Tais parâmetros de qualidade de água foram medidos usando uma sonda multiparâmetros (Horiba, modelo U-52). Os peixes durante todo período de aclimação foram alimentados com ração contendo 45-46% proteína bruta (PB), quatro vezes ao dia. Em seguida esses alevinos de pirarucu foram usados no ensaio *in vitro*, no teste de toxicidade e na análise histológica.

Ensaio *in vitro* com óleo essencial de *Mentha piperita*

Teste *in vitro* foi realizado para avaliar a ação de diferentes concentrações de *M. piperita* no controle de *D. cycloancistrum* e *D. cycloancistrioides* das brânquias de alevinos de *A. gigas*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por dois grupos controles, um usando somente água do tanque de cultivo (Controle 1) e outro usando água do tanque de cultivo e 80 µL de álcool etílico (Controle 2) e três diferentes concentrações (80, 160 e 320 mg/L) do óleo essencial de *M. piperita* diluídas em álcool etílico PA (1g:10 mL). Arcos branquiais de dez alevinos de pirarucu ($27,0 \pm 14,0$ g e $15,7 \pm 2,4$ cm), naturalmente parasitados, foram retirados e individualizados em placas de Petri (Eiras *et al.* 2006) contendo 8 mL de cada solução testada. Em cada arco os parasitos foram selecionados visualmente e observados a cada 15 minutos, em estereomicroscópio, para registro do número de parasitos vivos e mortos nesse período. Alguns critérios comportamentais dos parasitos monogenoideas foram adotados para determinar a eficácia *in vitro*, tais como: contração e relaxamento do corpo; redução na extensão ou velocidade da contração; letargia, desprendimento das brânquias e ausência de movimentos (morte). Todas as concentrações testadas e também os controles foram realizados em triplicatas, em um tempo máximo de 9 horas de exposição.

Teste de toxicidade aguda (CL_{50-4h}) com *Mentha piperita*

Para o teste de toxicidade aguda, utilizou-se 168 alevinos de pirarucu ($34,7 \pm 12,4$ g e $16,8 \pm 2,0$ cm) distribuídos em 14 tanques com capacidade de 100 litros cada, com volume final para 80 L e na densidade de 12 peixes/tanque. Em seguida, os peixes foram mantidos sem alimentação e em sistema estático, com aeração constante e água com temperatura média de $28,8 \pm 0,13$ °C, oxigênio dissolvido $8,9 \pm 0,06$ mg/L, pH $5,8 \pm 0,06$, amônia total de $0,12 \pm 0,007$ mg/L, alcalinidade média de $10,0 \pm 0$ mg CaCO₃/L, dureza $10,0 \pm 0$ mg CaCO₃/L e condutividade média de $0,03 \pm 0,0007$ μS/cm³. Cada tratamento foi constituído por duas repetições e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo dois grupos controles, um usando somente água do tanque de cultivo (Controle 1) e outro usando água do tanque de cultivo e 80 μL de álcool etílico (Controle 2) e seis concentrações (20, 40, 80, 100, 130 e 160 mg/L) do óleo essencial de *M. piperita*. Todas as concentrações de *M. piperita* foram diluídas em álcool etílico (1g:10 mL) e o valor da CL_{50-4h}, foi calculada usando o método de “Trimmed Spearman-Kärber”, com limite de 95% de confiança (Hamilton *et al.* 1977). Durante o período de 4 horas de exposição ao óleo de *M. piperita*, a mortalidade dos peixes foi registrada quando eles paravam o movimento opercular, a batida caudal e não respondiam a estímulos mecânicos, sendo imediatamente retirados para evitar o comprometimento da qualidade da água.

Análises histológicas das brânquias de *Arapaima gigas*

O primeiro arco branquial direito de seis peixes mortos (sendo três de cada repetição) durante o teste de toxicidade aguda foram coletados e fixados em formol 10% tamponado para análises histológicas. Os arcos branquiais foram descalcificados, desidratados em série crescentes de soluções de álcool (70%, 80%, 90% e 100%) e, em seguida processados em parafina seguindo técnicas de rotina. A seguir, foram realizados cortes histológicos em micrótomo manual (Leica RM 2245), obtendo-se secções de 6 μm, que foram corados com hematoxilina-eosina (HE), para análises morfológicas usando microscopia óptica comum. As imagens foram capturadas em fotomicroscópio (Zeiss Axiovert A1) com câmera acoplada (AxioCam ERc5s) e com auxílio de software de análise de imagem (Zen Lite 2012).

RESULTADOS

No teste *in vitro* com óleo essencial de *M. piperita* usando brânquias de *A. gigas* foram identificados duas espécies de monogenoideas (Figura 1).

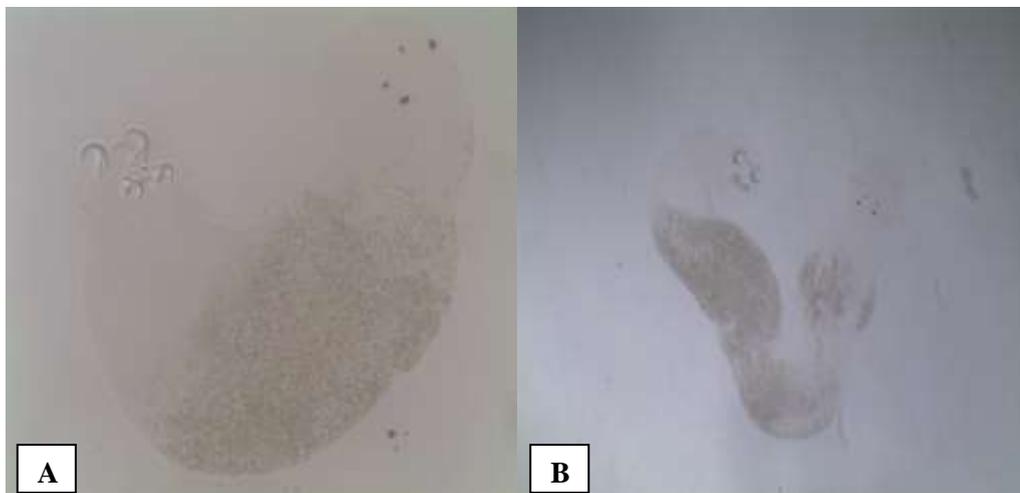


Figura 1. Espécies de monogenoideas das brânquias de *Arapaima gigas*. *Dawestrema cycloancistrioides* (A) e *Dawestrema cycloancistrum* (B).

No grupo controle, com somente água do cultivo, todos os monogenoideas morreram, em geral, ao final de nove horas do ensaio *in vitro*, com a deterioração das brânquias. No grupo controle que utilizou água do cultivo e álcool, alguns monogenoideas ainda apresentavam movimentos lentos ao final de nove horas, quando houve encerramento desse ensaio. Nas concentrações com 80, 160 e 320 mg/L do óleo essencial de *M. piperita* houve variação no tempo de mortalidade dos monogenoideas *Dawestrema* spp. (Tabela 1 e Figura 2).

Tabela 1. Efeitos *in vitro* das diferentes concentrações de óleo essencial de *Mentha piperita* em *Dawestrema* spp. das brânquias de *Arapaima gigas*. C1: Controle 1, C2: Controle 2.

Tempo	Concentração	Número de parasitos			
		Vivos	Letárgicos	Desprendidos	Mortos
0h	0 mg/L (C1)	34	0	0	0
	0 mg/L (C2)	82	0	0	0
	80 mg/L	37	0	0	0
	160 mg/L	33	0	0	0
	320 mg/L	30	0	0	0
30 min	0 mg/L (C1)	34	0	0	0
	0 mg/L (C2)	82	0	0	0
	80 mg/L	37	2	0	0
	160 mg/L	0	0	0	33
	320 mg/L	0	0	0	30
1h	0 mg/L (C1)	34	0	0	0
	0 mg/L (C2)	82	0	0	0
	80 mg/L	37	4	0	0
	160 mg/L	0	0	6	33
	320 mg/L	0	0	0	30
2h	0 mg/L (C1)	34	0	0	0
	0 mg/L (C2)	82	0	0	0
	80 mg/L	34	1	11	3
	160 mg/L	0	0	12	33
	320 mg/L	0	0	0	30
4h	0 mg/L (C1)	33	0	0	1
	0 mg/L (C2)	81	0	9	1
	80 mg/L	12	0	23	25
	160 mg/L	0	0	33	33
	320 mg/L	0	0	0	30
5h	0 mg/L (C1)	33	0	0	1
	0 mg/L (C2)	80	0	20	2
	80 mg/L	0	0	37	37
	160 mg/L	0	0	33	33
	320 mg/L	0	0	0	30
9h	0 mg/L (C1)	0	0	0	34
	0 mg/L (C2)	28	0	49	54
	80 mg/L	0	0	37	37
	160 mg/L	0	0	33	33
	320 mg/L	0	0	0	30

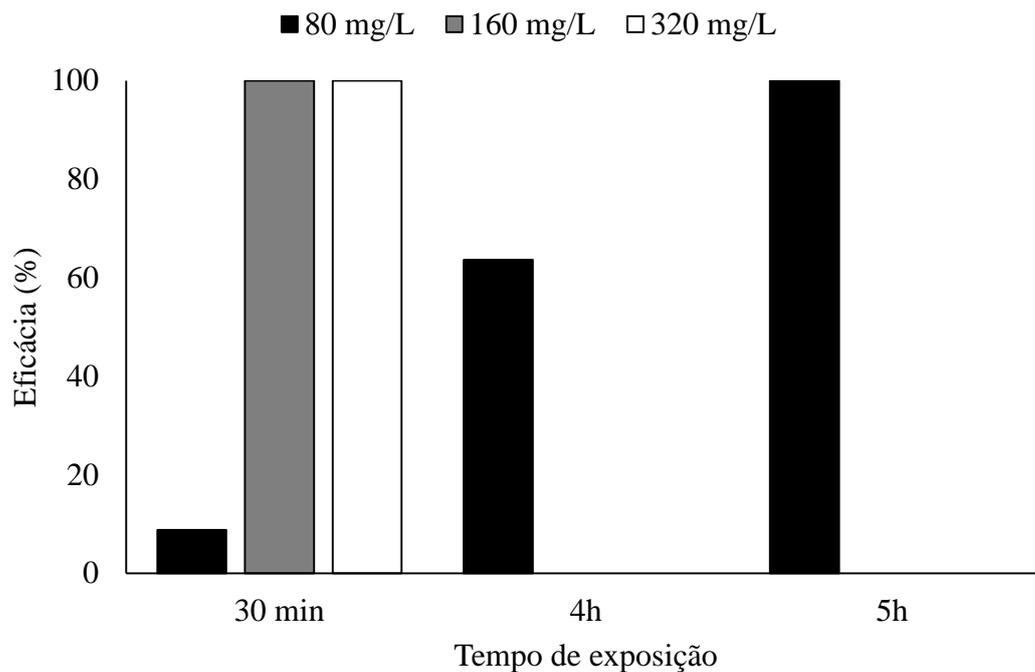


Figura 2. Eficácia de diferentes concentrações de óleo essencial de *Mentha piperita* contra *Dawestrema* spp. das brânquias de *Arapaima gigas*.

Durante o teste de toxicidade aguda, os peixes dos tratamentos com 40, 80, 100, 130, 160 mg/L de *M. piperita* apresentaram alterações comportamentais, tais como: agitação, batimento opercular acelerado, natação errática, perda do equilíbrio (ventre voltado para superfície) e letargia. Porém, nos peixes do tratamento com 20 mg/L foi verificado somente efeito anestésico (paralisia).

A taxa de mortalidade dos alevinos de *A. gigas* expostos a diferentes concentrações do óleo de *M. piperita* estão apresentados na Tabela 2, onde houve diferenças no número de mortalidade para todas as concentrações usadas, como esperado. O valor estimado da CL_{50-4h} de óleo essencial de *M. piperita* para *A. gigas*, foi de 38 mg/L.

Tabela 2. Teste de toxicidade aguda (CL50-4h) de óleo essencial de *Mentha piperita* para *Arapaima gigas*.

Concentrações (mg/L)	Nº peixes mortos ao final do teste		Mortalidade (%)
	Repetição 1	Repetição 2	
0	0	0	0
20	0	0	0
40	8	6	58,3
80	12	12	100
100	12	12	100
130	12	12	100
160	12	12	100

As análises histológicas não mostraram qualquer lesão visível nas brânquias de *A. gigas* de ambos os grupos controles, bem como nos peixes expostos a 20 e 40 mg/L de óleo essencial de *M. piperita*. Porém, nos peixes expostos a 80, 100, 130 e 160 mg/L desse óleo essencial houve elevações epiteliais, fusão das lamelas secundárias, hipertrofia e aneurisma, mas necrose ocorreu somente nos peixes expostos a 160 mg/L, a maior concentração usada (Figura 3).

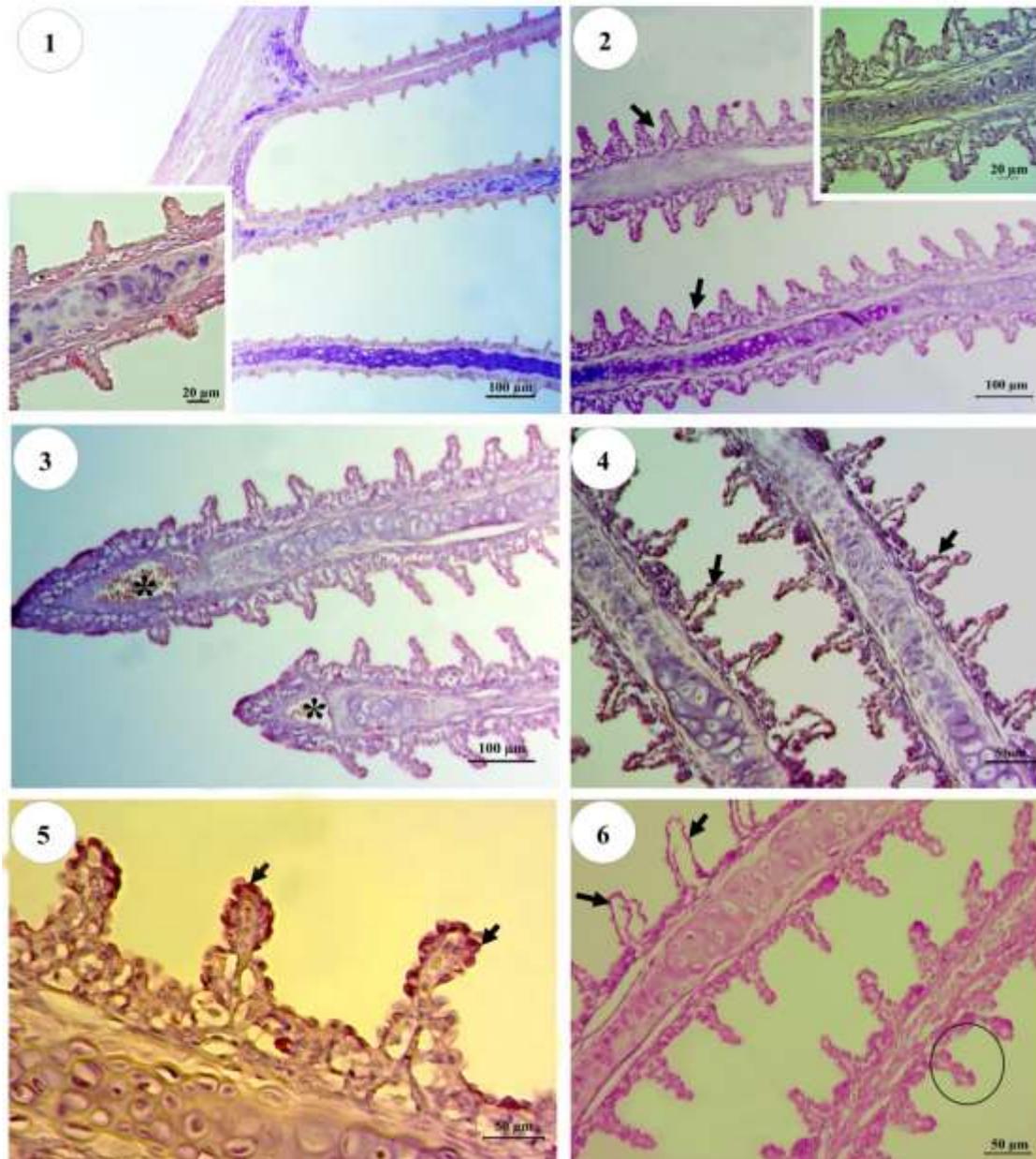


Figura 3.1-6. Brânquias de *Arapaima gigas* do grupo controle e expostos a diferentes concentrações de óleo essencial de *Mentha piperita*. Estrutura normal dos filamentos branquiais, mostrando em detalhes lamela primária e lamela secundária (1). Hiperplasia e fusão lamelar (setas) (2). Aneurisma nas pontas das lamelas primárias das brânquias (asteriscos) (3). Desprendimento do epitélio branquial (setas) (4 e 6). Tecido branquial com hipertrofia das células epiteliais (setas) (5). Tecido branquial com necrose (círculo) (6).

DISCUSSÃO

Dawestrema cycloancistrum e *D. cycloancistrioides* das brânquias de *A. gigas* não expostos a óleo essencial de *M. piperita* sobreviveram até nove horas de cultivo. Porém, monogenoideas *Dactylogyrus vastator* de *Carassius auratus* sobreviveram até 82 horas de cultivo (Zhang *et al.* 2014). Tais resultados são atribuídos às diferenças espécie-específica e metodologias de cultivo.

Dawestrema spp. das brânquias de *A. gigas* morreram em 30 minutos quando expostos a 160 e 320 mg/L de óleo essencial de *M. piperita*, enquanto os parasitos expostos a 80 mg/L mostraram mortalidade somente após 5 horas de exposição. Portanto, paralisia seguida de morte dos parasitos ocorreu em menor tempo nas maiores concentrações de *M. piperita*. Em camundongos, inoculação intraperitoneal com óleo essencial de *M. piperita* causou redução de 50% da viabilidade de protoescolex de *Echinococcus granulosus*, devido aos danos ultraestruturais induzidos pelo fitoterápico (Maggiore *et al.* 2012). *Mentha piperita* também demonstrou atividade anti-helmíntica *in vitro* contra larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos (Almeida *et al.* 2007), bem como para *Pheretima postuma* (Nikesh *et al.* 2011). O óleo essencial de *M. piperita*, apresentou um complexo bioativo que parece responsável pela a ação anti-helmíntica *in vitro* deste estudo. Plantas bioativas, como *M. piperita*, por conter um grande número de metabólitos secundários ou substâncias farmacologicamente ativas, que agindo isoladamente ou em combinação podem produzir efeito direto ou indireto sobre parasitos (Yadegarinia *et al.* 2006).

A busca por compostos antiparasitários de origem vegetal deve-se à escassez de compostos comerciais que eliminem parasitos de forma eficiente e com menor toxicidade. Porém, plantas medicinais ou seus derivados, quando utilizados para fins profiláticos e terapêuticos, devem sempre ser testados quanto a sua toxicidade, pois os limites de tolerância podem variar de acordo com a espécie de peixes, idade, tamanho e com o tempo de exposição ao produto (Winkaler *et al.* 2007; Tavechio *et al.* 2009). Para *A. gigas*, a mortalidade aumentou com o aumento da concentração de óleo essencial de *M. piperita* e a CL_{50-4h} foi de 38 mg/L. Essa concentração de óleo essencial de *M. piperita* mostrou elevada toxicidade para concentração letal média se comparada ao extrato de *Carica papaya* para *Clarias gariepinus* (Ayotunde *et al.*, 2010) e *Azadirachta indica* para *Prochilodus lineatus* (Winkaler *et al.* 2007). Porém, são todas plantas com diferentes compostos bioativos.

Brânquias são órgãos de extrema importância para os peixes, uma vez que desempenham várias funções vitais, tais como respiração, osmorregulação, excreção de produtos nitrogenados e regulação do equilíbrio ácido-base (Cinar *et al.* 2009). Descamação do epitélio respiratório branquial e hiperplasia das células interlamelar de *Oreochormis niloticus* exposto a extrato etanólico bruto e frações das folhas da planta *Eugenia uniflora* foi descrito por Fiuza *et al.* (2011). Secreção de muco, hiperplasia, fusão das lamelas, elevação do epitélio e necrose ocorreram em *Heteropneustes fossilis* tratados com extrato de *A. indica* (Kumar *et al.* 2010). Portanto, em peixes expostos a substâncias químicas ou produtos naturais, as respostas funcionais e morfológicas das brânquias podem ser parâmetros relevantes na determinação das concentrações tóxicas e clínicas.

As brânquias de *A. gigas* apresentaram levantamento do epitélio lamelar, fusão das lamelas secundárias, hiperplasia das células epiteliais e aneurisma após 4 horas de exposição a 80, 100, 130 e 160 mg/L de *M. piperita*. Porém, tais alterações teciduais não ocorreram nas brânquias dos peixes controles e dos expostos a 20 e 40 mg/L de *M. piperita*, que teve somente um efeito anestésico. Alterações morfológicas branquiais tais como elevação do epitélio e hiperplasia das células epiteliais podem ser estratégias adaptativas a agentes irritantes, servindo como uma barreira para a entrada de xenobióticos na corrente sanguínea. Mas, aneurisma nas lamelas branquiais são lesões resultantes de rupturas das células pilares causados por xenobióticos (Winkaler *et al.*, 2007), tais como *M. piperita*. Assim, as lesões branquiais em *A. gigas* levaram a uma redução da sua capacidade respiratória, ocasionando a morte desses peixes quando submetidos a elevadas concentrações de *M. piperita*.

Em conclusão, óleo essencial de *M. piperita* mostrou, *in vitro*, ter atividade anti-helmíntica dose dependente contra *Dawestrema cycloancistrum* e *Dawestrema cycloancistrioides*. A análise estrutural das brânquias foi um método prático e válido para determinar a toxicidade causada pelo óleo essencial de *M. piperita* em *A. gigas*. Como banhos terapêuticos com óleo essencial de *Mentha piperita* para *A. gigas* devem ser em concentrações de aproximadamente 20 mg/L, novas estratégias devem ser realizadas para investigar a eficácia também *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido de acordo com os princípios adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e Bolsa PQ concedida a Tavares-Dias, M.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Almeida, M.A.O. de; Domingues, L.F.; Almeida, G.N.; Simas, M.M. dos S.; Botura, M.B.; Cruz, A.C.F.G. da; *et al.* 2007. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Mentha piperita* L. e de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre cultivos de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de caprinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 16(1): 57-59.
- Araújo, C.S.O.; Gomes, A.L.; Tavares-Dias, M.; Andrade, S.M.S.; Belém-Costa, A.; Borges, J.T.; *et al.* 2009. Parasitic infections in pirarucu fry, *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) kept in a semi-intensive fish farm in Central Amazon, Brazil. *Veterinaski Arhiv*, 79(5): 499-507.
- Ayotunde, E.O.; Offem, B.O.; Okey, I.B.; Ikpi, G.U.; Ochang, S.N.; Agbam, N.E.; Omini, D.E. 2010. Toxicity of pawpaw (*Carica papaya*) seed powder to sharptooth catfish *Clarias gariepinus* fingerlings and effects on haematological parameters. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, 2(3): 71-78.
- Cinar, K.; Aksoy, A.; Emre, Y.; Asti, R.N. 2009. The histology and histochemical aspects of gills of the flower fish, *Pseudophoxinus antalyae*. *Veterinary Research Communications*, 33:453-460.
- Chagas, E.C.; Araújo, L.D.; Gomes, L.C.; Malta, J.C.O.; Varella, A.M.B. 2012. Efeito do cloreto de sódio sobre as respostas fisiológicas e controle de helmintos monogenóides em tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Acta amazônica*, 42(3): 439-444.
- Chagas, E.C.; Gomes, L.C.; Silva, A.L.F.; Brandão, F.R. 2006. Respostas fisiológicas de tambaqui a banhos terapêuticos com mebendazol. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41 (4): 713-716.

- Delgado, P.M.; Chu-Koo, F.W.; Malta, J.C.O.; Gomes, A.L.S.; Varella, A.M.B.; Martin, S.T. 2007. Fauna ectoparasitaria en alevinos de paiche *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) cultivados en el centro de investigaciones de Quistococha, Loreto, Perú. *Folia Amazónica*, 16(1-2): 23-27.
- Eiras, J.C.; Takemoto, R.M.; Pavanelli, G.C. 2006. *Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes*. 2da ed. Maringá: Ed. EDUEM, 199 p.
- Fiuza, T.S.; Silva, P.C.; Paula, J.R.; Tresvenzol, L.M.F.; Souto, M.E.D.; Sabóia-Morais, S.M.T. 2011. Análise tecidual e celular das brânquias de *Oreochromis niloticus* L. tratadas com extrato etanólico bruto e frações das folhas da pitanga (*Eugenia uniflora* L.) – Myrtaceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13(4): 389-395.
- Fujimoto, R.Y.; Vendruscolo, L.; Schalch, S.H.C.; Moraes, F.R. 2006. Avaliação de três diferentes métodos para o controle de monogenéticos e *Capillaria* sp. (Nematoda: Capillariidae), parasitos de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare* Liechtenstein, 1823). *Boletim do Instituto de Pesca*, 32(2): 183-190.
- Garlet, T.M.B.; Santos, O.S.; Medeiros, S.L.P.; Manfron, P.A.; Garcia, D.C.; Borcioni, E.; et al. 2007. Produção e qualidade do óleo essencial de menta em hidroponia com doses de potássio. *Ciência Rural*, 37(4): 956-962.
- Hamilton, M.A.; Russo, R.C.; Thurston, N.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 7: 714-719.
- Harikrishnan, R.; Balasundaram, C.; Heo, M.S. 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317(1-4): 1-15.
- Kumar, A.; Prasad, M. R.; Srivastava, K.; Tripathi, S.; Srivastava, A.K. 2010. Branchial histopathological study of catfish *Heteropneustes fossilis* following exposure to purified nem extract, azadirachtin. *World Journal of Zoology*, 5(4): 239-243.
- Maggiore, M.A.; Albanese, A.A.; Gende, L.B.; Eguaras, M.J.; Denegri, G.M.; Elissondo, M.C. 2012. Anthelmintic effect of *Mentha* spp. essential oils on *Echinococcus granulosus* protoscoleces and metacestodes. *Parasitology Research*, 110(3): 1103-1112.
- Marinho, R.G.B.; Tavares-Dias, M.; Dias-Grigório, M.K.R.; Neves, L.R.; Yoshioka, E.T.O.; Boijink, C.L.; et al. 2013. Helminthes and protozoan of farmed pirarucu (*Arapaima gigas*) in eastern Amazon and host-parasite relationship. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(4): 1192-1202.

- Maximiano, A.A.; Fernandes, R.O.; Nunes, F.P.; Assis, M.P.; Matos, R.V.; Barbosa, C.G.S.; *et al.* 2005. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. *Ciência & Saúde Coletiva*, 10: 483-491.
- Mckay, D.L.; Blumberg, J.B. 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, 20: 619-633.
- Morais, S.R.; Oliveira, T.L.S.; Bara, M.T.F.; Conceição, E.C.; Rezende, M.H.; Ferri, P.H.; *et al.* 2012. Chemical constituents of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) leaves cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil. *International Journal of Analytical Chemistry*, 1-4.
- Murthy, K.S.; Kiran, B.R. 2013. Review on usage of medicinal plants in fish diseases. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 4(3): (B) 975-986.
- Nikesh, M.; Binitha, G.; Rekha, S.; Ravindra, N.; Anto Shering, M. 2011. Comparative *in vitro* anthelmintic activity of chloroform and cetone extracts of *mentha piperita*. *International Journal of Pharmaceutical Biological Archives*, 2(3): 945-948.
- Núñez, J.; Chu-Koo, F.; Berland, M.; Arévalo, L.; Ribeyro, O.; Duponchelly, F.; *et al.* 2011. Reproductive success and fry production of the paiche or pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz), in the region of Iquitos, Peru. *Aquaculture Research*, 42: 815-820.
- Ono, E.A.; Nunes, E.S.S.; Cedano, J.C.C.; Filho, M.P.; Roubach, R. 2008. Digestibilidade aparente de dietas práticas com diferentes relações e energia: proteína em juvenis de pirarucu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(2): 249-254.
- Pandey, G. 2013. Some medicinal plants to treat fish ectoparasitic infections. *International Journal of Pharmaceutical & Research Sciences*, 2(2): 532-538.
- Peixoto, I.T.A.; Furlanetti, V.F.; Anibal, P.C.; Duarte, M.C.T.; Hofling, J.F. 2009. Potential pharmacological and toxicological basis of the essential oil from *Mentha* spp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 30(3): 235-239.
- Samber, N.; Varma, A.; Manzoor, N. 2014. Evaluation of *Mentha piperita* essential oil and its major constituents for antifungal activity in *Candida* spp. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 3 (2): 9404-9411.
- Tavares-dias, M.; Ferreira, J.S.; Affonso, E.G.; Ono, E.A.; Martins, M.L. 2011. Toxicity and effects of copper sulfate on parasitic control and hematological response of tambaqui *Colossoma macropomum*. *Boletim do Instituto de Pesca*, 37(4): 355-365.

- Tavechio, W.L.G.; Guidelli, G.; Portz, L. 2009. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em pisciculturas. *Boletim do Instituto de Pesca*, 35(2): 335-341.
- Tu, X.; Ling, F.; Huang, A.; Zhang, Q.; Wang, G. 2013. Anthelmintic efficacy of *Santalum album* (Santalaceae) against monogenean infections in goldfish. *Parasitology Research*. 112: 2839–2845.
- Yadegarinia, D.; Gachkar, L.; Rezaei, M.B.; Taghizadeh, M.; Astaneh, S.A.; Rasooli, I. 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, 67: 1249-1255.
- Winkaler, E. U.; Santos, T.R.M.; Machado-Neto, J.G.; Martinez, C.B.R.2007. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part C)*, 145: 236–244.
- Zhang, X.P.; Li, W.X.; Ai, T. S.; Zou, H.; Wu, S.G.; Wang, G.T. 2014. The efficacy of four common anthelmintic drugs and traditional Chinese medicinal plant extracts to control *Dactylogyrus vastator* (Monogenea). *Aquaculture*, 420-421: 303-307.