



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

Cleize Sales da Silva

**Uso de óleos essenciais como antiparasitários de *Neobenedenia* sp presente na tainha  
*Mugil liza***

Florianópolis  
2023

Cleize Sales da Silva

**Uso de óleos essenciais como antiparasitários de *Neobenedenia* sp presente na tainha  
*Mugil liza***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Aquicultura.

Orientador: Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira

Florianópolis

2023

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

Silva, Cleize Sales da  
Uso de óleos essenciais como antiparasitários de  
Neobenedenia sp presente na tainha Mugil liza / Cleize  
Sales da Silva ; orientador, Vinícius Ronzani Cerqueira,  
2023.  
73 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós  
Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Monogenea. 3. Óleos essenciais. 4.  
Piscicultura Marinha. I. Cerqueira, Vinícius Ronzani . II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Aquicultura. III. Título.

Cleize Sales da Silva

**Uso de óleos essenciais como antiparasitários de *Neobenedenia* sp presente na tainha  
*Mugil liza***

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 29 de dezembro de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

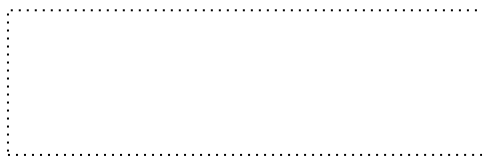
Prof. Vinicius Ronzani Cerqueira, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Robson Andrade Rodrigues, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

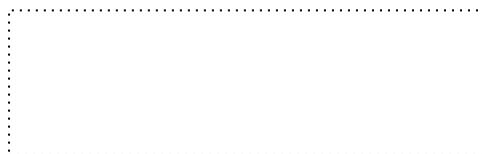
Prof.<sup>a</sup> Marcia Valéria Silva do Couto, Dr.<sup>a</sup>  
Casa-Escola da Pesca - Funbosque

Prof.<sup>a</sup> Aline Brum Figueredo, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade do Estado de Santa Catarina

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



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2023

A mulher mais incrível que já conheci:

Maria, a minha mãe.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira, que tem contribuído com minha formação com paciência, dedicação e apoio por todos estes anos.

Ao Dr. Maurício Laterça Martins, pelo comprometimento e pelo fornecimento de material biológico.

A equipe do Laboratório de Piscicultura Marinha da UFSC pelas inúmeras amostras analisadas dos experimentos. Sem a colaboração de vocês esse trabalho não seria possível de realizar.

A minha querida amiga Vanessa Rocha, que não largou minha mão, faça sol ou faça chuva.

A minha amada e querida amiga, companheira, família Cynthia Ferreira que está ao meu lado dando todo apoio para que eu possa realizar todos os meus sonhos loucos.

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

A todos, o meu muito OBRIGADA!

“Não podemos todos evoluir quando metade de nós fica para trás”.

Malala Yousafzai

## RESUMO

As práticas intensivas e semi-intensivas de produção na piscicultura vêm causando aumento na incidência de doenças. Entre os agentes causadores, os ectoparasitos da classe Monogenea causam várias alterações epiteliais e hematológicas nos hospedeiros. Na aquicultura, o uso de produtos químicos tem sido uma das formas mais utilizadas de controlar e tratar doenças, porém os produtos fitoterápicos como os óleos essenciais vêm ganhando destaque no controle de enfermidades em peixes. O objetivo do primeiro estudo foi encontrar a concentração ideal de fitoterápicos e quimioterápicos contra *Neobenedenia* sp. *in vitro*. Os parasitos foram coletados de reprodutores de tainhas *Mugil liza*. Foram realizados testes *in vitro* com soluções de óleos essenciais de *Lippia alba*, *L. origanoides*, *L. sidoides* e *Mentha piperita* (100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 mg L<sup>-1</sup>), formolalina (100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 mg L<sup>-1</sup>), permanganato de potássio (1,5, 2,5, 3,5, 4 e 5 mg L<sup>-1</sup>), peróxido de hidrogênio (90, 180, 200, 250, 300 e 350 mg L<sup>-1</sup>) e cloreto de sódio (0, 5 e 10 mg L<sup>-1</sup>). Os tratamentos com 100% de mortalidade do parasito foram nas concentrações de 600 e 700 mg L<sup>-1</sup> de *L. origanoides* (1 min) e 350 mg L<sup>-1</sup> (3 min) de peróxido de hidrogênio. Esse estudo mostrou diferenças na dose-resposta dos produtos testados para *Neobenedenia* de tainha. O objetivo do segundo estudo foi utilizar uma ração suplementada com óleo essencial de *L. origanoides*, como antiparasitário de *Neobenedenia* sp. Foram 4 tratamentos e um controle (em triplicata) com densidade de 10 peixes por tanque e alimentados com ração contendo óleo essencial nas seguintes concentrações: 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0%. Os juvenis de tainha foram alimentados quatro vezes ao dia por 77 dias. Ao final do experimento foram realizadas a biometria de todos os peixes, coleta dos parasitos e coleta de sangue, para posterior análise. Os índices parasitológicos de *M. liza* alimentadas com as dietas contendo o óleo foram semelhantes aos dos peixes do controle. Os maiores valores de abundância e intensidade média de parasitismo foram registrados no tratamento controle. As concentrações de 1,0 e 1,5% tiveram um único indivíduo que não apresentou parasitos em sua superfície corporal. As concentrações testadas do óleo de *L. origanoides* suplementado na ração em juvenis de tainha *M. liza* não foram eficazes na eliminação do monogenoide *Neobenedenia* sp. Portanto, não recomendamos a utilização desse tratamento.

**Palavras-chave:** Aquicultura, Monogenea. Óleos essenciais. Piscicultura Marinha.



## ABSTRACT

The Intensive and semi-intensive production practices have been causing an increase in the incidence of diseases. Among the causative agents, Monogenea cause several epithelial and haematological alterations in the hosts. In aquaculture, the use of chemicals has been one of the most used ways to control and treat diseases, but herbal products such as essential oils have been gaining prominence in controlling diseases in fish. The objective of the first study was to find the ideal concentration of herbal and chemotherapeutic drugs, for the mortality of parasites, in the shortest possible time. The parasites were collected from mullets (*Mugil liza*) broodstock. In vitro tests were performed with oil solutions of *Lippia alba*, *L. organoides*, *L. cidoides* and *Mentha piperita* (100, 200, 300, 400, 500, 600 and 700 mg L<sup>-1</sup>), formaldehyde (100, 200, 300, 400, 500, 600 and 700 mg L<sup>-1</sup>), potassium permanganate (1.5, 2.5, 3.5, 4 and 5 mg L<sup>-1</sup>), hydrogen peroxide (90, 180, 200, 250, 300 and 350 mg L<sup>-1</sup>) and salinities (0, 5 and 10 mg L<sup>-1</sup>). The 100% effective treatments occurred at concentrations of 600 and 700 mg L<sup>-1</sup> of *L. organoides* (1 min) and 350 mg L<sup>-1</sup> (3 min) of hydrogen peroxide. This study showed differences in the dose-response of the products tested for *Neobenedenia* parasite of the mullet. The objective of the second study was to use *L. organoides* essential oil as an antiparasitic against *Neobenedenia* sp, supplemented in the feed. Four treatments and one control (in triplicate) were carried out with a density of 10 mullet juveniles per tank and fed a diet with essential oil at the following concentrations: 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0%. The fish were fed four times a day for 77 days. At the end of the experiment, all the fish were measured, parasites were collected, and blood was sampled for further analysis. The parasitological indices of *M. liza* fed diets with essential oil were similar to the non-treated fish. The highest parasite abundance and average intensity values were registered in the control. The treatments 1.0 and 1.5% had a single specimen that did not present parasites on its body surface. The tested concentrations of *L. organoides* supplemented in the diet of *M. liza* mullet juveniles were not effective in eliminating the monogenoid *Neobenedenia* sp.

**Keywords:** Aquaculture, Essential oils. Marine fish farming. Monogenea.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Tainha *M. liza* do Laboratório de piscicultura marinha da UFSC. .... 15
- Figura 2. A) *Neobenedenia* sp. obtido de reprodutores de tainha do LAPMAR. Aumento 12.5 x. B) Ovos de *Neobenedenia* sp. obtidos após exposição *in vitro* com álcool de cereal (700 mg L<sup>-1</sup>, aumento 35x). .... 17
- Figura 3. Tempo de mortalidade total de *Neobenedenia* sp. de acordo com as concentrações de *Lippia origanoides* (3A), *Lippia sidoides* (3B) e *Mentha piperita* (3C), no teste *in vitro*. Os resultados estão expressos em regressão linear, utilizando a média de 3 repetições (n = 10 *Neobenedenia* sp. por réplica) O tratamento com álcool de cereais, até na concentração de 700 mg L<sup>-1</sup>, não causou mortalidade dos Monogenea durante oito horas de exposição testado..... 33
- Figura 4. Tempo de mortalidade total de *Neobenedenia* sp. de acordo com as concentrações de Peróxido de Hidrogênio (4A), Permanganato de potássio (4B), Salinidade (4C) e Formol (4D), no teste *in vitro*. Os resultados são expressos em regressão linear, utilizando a média e desvio padrão de 3 repetições (n = 10 *Neobenedenia* sp. por réplica). .... 35
- Figura 5. Regressão linear das variáveis de desempenho zootécnico de juvenis de *Mugil liza* suplementados com óleo essencial de *Lippia origanoides* nas concentrações 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% no período de 62 dias. Nível de significância p< 0,05..... 56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desempenho zootécnico de juvenis de <i>Mugil liza</i> suplementados com óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> nas concentrações 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% no período de 62 dias. ....	55
Tabela 2. Índices parasitológicos de <i>Neobenedenia</i> sp, em juvenis de <i>M. Liza</i> com ração suplementada com óleo essencial de <i>L. origanoides</i> . ....	56
Tabela 3. Médias e Desvio Padrão dos parâmetros hematológicos e glicose de juvenis de tainha <i>M. liza</i> alimentados com ração suplementada com óleo essencial de <i>L. origanoides</i> , durante 62 dias de experimento. ....	57

## LISTA DE APÊNDICE

Apêndice 1. Composição química do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> . .....	70
Apêndice 2. Composição química do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> . .....	71
Apêndice 3. Composição química do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> . .....	72
Apêndice 4. Composição química do óleo essencial de <i>Mentha piperita</i> . .....	73

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>14</b>
1.1	QUIMIOTERÁPICOS .....	18
1.2	<i>LIPPIA ALBA</i> .....	19
1.3	<i>LIPPIA ORIGANOIDES</i> .....	20
1.4	<i>LIPPIA SIDOIDES</i> .....	21
1.5	<i>MENTHA PIPERITA</i> .....	22
1.6	OBJETIVOS .....	22
<b>1.6.1</b>	<b>Objetivos geral .....</b>	<b>23</b>
<b>1.6.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>23</b>
1.7	FORMATAÇÃO DOS CAPÍTULOS DA TESE .....	23
<b>2</b>	<b>ARTIGOS .....</b>	<b>24</b>
2.1	ARTIGO 1 .....	24
<b>2.1.1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Material e Métodos .....</b>	<b>28</b>
2.1.2.1	<i>Material Biológico.....</i>	28
2.1.2.2	<i>Composição química dos óleos essenciais .....</i>	28
2.1.2.3	<i>Teste in vitro dos óleos essenciais e quimioterápicos .....</i>	29
2.1.2.4	<i>Identificação dos parasitos.....</i>	30
2.1.2.5	<i>Análise estatística .....</i>	30
<b>2.1.3.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>31</b>
2.1.3.1	<i>Composição química dos óleos essenciais .....</i>	31
2.1.3.2	<i>Teste in vitro dos óleos essenciais .....</i>	31
2.1.3.3	<i>Teste in vitro com formol, peróxido de hidrogênio, permanganato de potássio e cloreto de sódio.....</i>	34
<b>2.1.4.</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>35</b>
2.1.4.1	<i>Teste in vitro com óleos essenciais .....</i>	35
2.1.4.2	<i>Teste in vitro com formol, peróxido de hidrogênio, permanganato de potássio e cloreto de sódio.....</i>	38
<b>2.1.5.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1.6</b>	<b>Agradecimentos .....</b>	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>
2.2	ARTIGO 2 .....	48

<b>2.2.1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>50</b>
<b>2.2.2.</b>	<b>Material e métodos.....</b>	<b>51</b>
2.2.2.1	<i>Composição química dos óleos essenciais .....</i>	<i>51</i>
2.2.2.2	<i>Preparo das dietas experimentais.....</i>	<i>52</i>
2.2.2.3	<i>Delineamento experimental .....</i>	<i>52</i>
2.2.2.4	<i>Monitoramento da qualidade da água.....</i>	<i>53</i>
2.2.2.5	<i>Análise do desempenho zootécnico.....</i>	<i>53</i>
2.2.2.6	<i>Análise parasitológica .....</i>	<i>53</i>
2.2.2.7	<i>Coleta de sangue e análise dos parâmetros hematológicos e glicose .....</i>	<i>53</i>
2.2.2.8	<i>Análise estatística .....</i>	<i>54</i>
<b>2.2.3.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>54</b>
2.2.3.1	<i>Composição química dos óleos essenciais .....</i>	<i>54</i>
2.2.3.2	<i>Desempenho zootécnico.....</i>	<i>55</i>
2.2.3.3	<i>Variáveis parasitológicas .....</i>	<i>56</i>
2.2.3.4	<i>Variáveis hematológicas e glicose.....</i>	<i>57</i>
<b>2.2.4.</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>57</b>
2.2.4.1	<i>Desempenho zootécnico.....</i>	<i>57</i>
2.2.4.2	<i>Variáveis parasitológicas .....</i>	<i>58</i>
2.2.4.2	<i>Variáveis hematológicas e glicose.....</i>	<i>59</i>
<b>2.2.5.</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>64</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura é um dos ramos da produção animal que mais cresce no mundo, contribuindo com mais da metade do pescado consumido, colaborando de forma significativa para geração de emprego e renda da população (FAO, 2020). Em 2020 o crescimento da aquicultura, particularmente na Ásia, fez com que a produção total de pesca e aquicultura atingisse um recorde histórico de 214 milhões de toneladas (178 milhões de toneladas de peixes aquáticos 36 milhões de toneladas de algas). Em 2020, mais de 157 milhões de toneladas, ou seja, 89% da produção de animais aquáticos, foram destinados ao consumo humano direto. Os alimentos aquáticos contribuíram com cerca de 17% da proteína de origem animal consumida em 2019, chegando a 23% em países de renda média baixa e mais de 50% em partes da Ásia e África (FAO, 2022).

No Brasil, a produção aquícola foi de 579,3 mil toneladas no ano de 2018. Deste total, 45,8 mil toneladas de camarões em cativeiro, 14,2 mil toneladas de moluscos bivalves e 519,3 mil toneladas representado pela piscicultura continental. A aquicultura marinha no país ainda se restringe basicamente à criação de camarões e à criação de moluscos bivalves, enquanto a piscicultura marinha ainda não tem registros oficiais da produção comercial (IBGE, 2019; FAO, 2020). Dentre as espécies brasileiras de peixes marinhos que apresentam potencial econômico e socioambiental para a criação em cativeiro, destacam-se o bijupirá (*Rachycentron canadum*), garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*), robalos flecha (*Centropomus undecimalis*) e peva (*C. parallelus*), carapeba (*Eugerres brasilianus*), linguado (*Paralichthys orbignyanus*), pampo (*Trachinotus marginatus*) e a tainha (*Mugil liza*). A criação de Mugilídeos é uma realidade em vários países do mundo, sendo o Egito o maior produtor de *Mugil cephalus* (FAO, 2011), seguido pela Coreia, Taiwan, Israel e China. Segundo dados da FAO, foram produzidas mais de 114 mil toneladas dessa espécie em 2018 (FAO/Fishstat, 2020).

*Mugil liza* Valenciennes, 1836 conhecida popularmente como tainha, como os demais membros da família Mugilidae, é uma espécie de peixe pelágica encontrada na costa Atlântica da América do Sul, desde o Caribe até a Argentina (MENEZES et al., 2010; DURAND et al., 2012; LEMOS et al., 2014). As tainhas podem atingir cerca de 1 m de comprimento e até 8 Kg (VIEIRA e SCALABRINI, 1991), sendo considerada a espécie mais importante de Mugilídeo para a atividade pesqueira no Brasil, e um importante recurso econômico na região Sul, principalmente para a pesca artesanal (MPA/MMA, 2015) (Figura 1). A tainha é uma espécie emblemática, tanto por sua importância econômica quanto sociocultural, pois constitui um dos

mais tradicionais recursos pesqueiros do Sudeste e Sul do Brasil, tornando-se fundamental para os modos de vida de mais de vinte mil pescadores artesanais e mais de mil outros pescadores que trabalham na pesca industrial (BRASIL, 2015).

Figura 1. Tainha *M. liza* do Laboratório de piscicultura marinha da UFSC.



Fonte: Magnotti, 2019.

Em relação à biologia reprodutiva, a tainha é uma espécie bissexuada, que apresenta formação de cardumes e hábitos migratórios, sendo catádromos com recrutamento dos juvenis em lagoas e estuários, seguido de um período de migração no mar para reprodução (ALBIERI e ARAÚJO, 2010). A reprodução ocorre do final do outono ao início do inverno (maio a agosto), com pico em maio e junho, e a desova ocorre em mar aberto, entre o norte do Rio Grande do Sul e São Paulo (CERQUEIRA et al., 2017), quando as temperaturas da água se encontram em torno de 18-21 °C.

De acordo com Albieri e Araújo (2010), a tainha apresenta desova total e o desenvolvimento ovocitário ocorre de maneira sincrônica em dois grupos. A presença contínua de recrutas ao longo do ano confirma que a tainha apresenta uma desova sincrônica de dois grupos, conforme também descrito por González-Castro et al. (2011) e Garbin et al. (2014). Em relação a fecundidade, alguns estudos relatam cerca de 3.080.000 ovócitos por fêmea adulta entre 590 e 680 mm de comprimento total (TL) (ALBIERI e ARAÚJO, 2010), enquanto em condições controladas de cultivo, a fecundidade da espécie varia de 1,0 a 1,5 milhão de ovos/kg de peso corporal (CERQUEIRA et al., 2017).

Do ponto de vista da aquicultura, a tainha *M. liza* é uma espécie que apresenta características que a qualificam para o cultivo, tais como: rusticidade, ampla tolerância às diferentes salinidades e temperaturas, adaptação ao cativeiro e fácil manejo alimentar, pois aceita rapidamente a dieta inerte (NETO e SPACH, 1998; SAMPAIO et al., 2001; SAMPAIO et al., 2002; MIRANDA-FILHO et al., 2010). Além disso, apresenta carne saborosa e a gônada feminina (ova) é bastante apreciada no Brasil e em outros países como Taiwan, França e Grécia.



No Brasil, pesquisas voltadas ao cultivo da tainha em cativeiro iniciaram em 1979, no Rio de Janeiro (BENETTI e FAGUNDES NETTO, 1980), em Santa Catarina (ANDREATTA et al., 1981) e, posteriormente, em São Paulo (YAMANAKA et al., 1992; GODINHO et al., 1993). Em 2014, o Laboratório de Piscicultura Marinha (Lapmar) da Universidade Federal de Santa Catarina retomou as pesquisas com essa espécie realizando trabalhos voltados à captura, transporte, adaptação de reprodutores selvagens em cativeiro, reprodução induzida e larvicultura (PASSINI et al., 2015; CERQUEIRA et al., 2017; CARVALHO et al., 2019, CASTRO et al., 2019, MAGNOTTI et al., 2020). Outros trabalhos voltados ao cultivo de mugilídeos também já foram realizados por pesquisadores da Universidade Federal de Rio Grande e do Instituto de Pesca como a determinação das condições ideais de temperatura (OKAMOTO et al. 2006), salinidade (NETO e SPACH, 1999), exigência proteica (ITO e BARBOSA, 1997; CARVALHO et al., 2010) e densidade de estocagem (SAMPAIO et al., 2001) em cultivo.

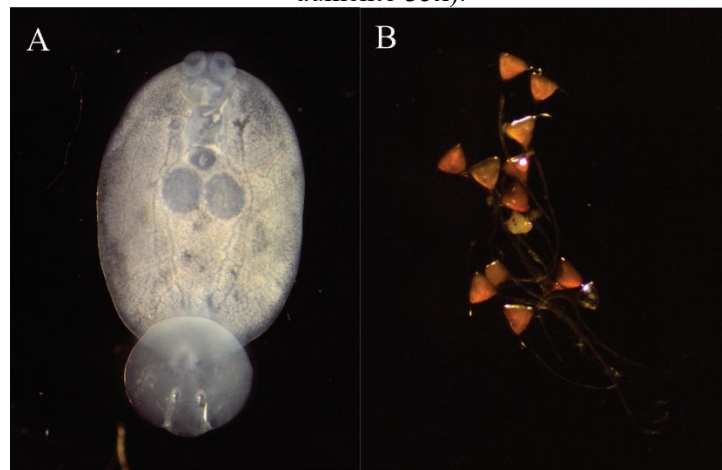
No entanto, com a intensificação do cultivo, o surgimento de enfermidades aumenta proporcionalmente à elevação das densidades de estocagem, da quantidade de alimento oferecido, e das excretas geradas, além disso, a flutuação dos parâmetros de qualidade da água em sistemas aquícolas gera estresse deixando os animais susceptíveis a enfermidades (LEIRA et al., 2017), sendo assim, é necessário o aumento de estudos relacionados a patógenos de peixes cultivados. Entre os agentes causadores de doenças em peixes podemos destacar os ectoparasitos da classe Monogenea que em grande número, causam várias alterações epiteliais e hematológicas nos hospedeiros (ARAÚJO et al., 2009; TAVARES-DIAS et al., 2008), predispondo o hospedeiro a infecções secundárias e muitas vezes levando a uma mortalidade elevada dentro de um lote (HUANG et al., 2013; OGAWA, 2015). Na América do Sul, os Monogenea de peixes marinhos são representados por 244 espécies pertencentes a 32 famílias (KOHN et al., 2016).

Doenças parasitárias já foram descritas em *Mugil liza* por Citti et al. (2014) que relataram a presença do *Ascocotyle (Phagicola)* um parasita trematódeo digenético em tainhas capturadas do ambiente natural e por Santos Gueretz et al. (2019) que descreveram a prevalência de metacercárias tanto em órgãos como em musculatura de *M. liza* capturadas na Baía do Babitonga estado de Santa Catarina. Abdallah et al. (2009) também descreveram a ocorrência de quatro espécies de *Ligophorus* pertencentes ao grupo Monogenea (*L. tainhae* n. sp., *L. brasiliensis* n. sp., *L. guanduensis* n. sp., e *L. lizae* n. sp.) coletados das brânquias de tainhas do Rio Guandu estado do Rio de Janeiro. Além disso, também foram registradas para *Mugil liza* no litoral sul do Rio Grande do Sul a espécie *Ligophorus uruguayense* (SIQUIER e

NÚÑEZ, 2009) e *Solostamenides platyorchis* (PAHOR-FILHO et al., 2012), encontradas nas brânquias. No entanto, o Monogenea *Neobenedenia pacifica* foi registrado para Mugilídeos em La Paz, Baixa Califórnia, México (BRAVO-HOLLIS, 1971).

O gênero *Neobenedenia* Yamaguti 1963, (Monogenea: Capsalidae), é um ectoparasito de peixes marinhos frequentemente encontrado nos cultivos (WHITTINGTON, 2004) (Figura 2 A). Espécies do gênero *Neobenedenia* são conhecidas por serem ectoparasitas prejudiciais e já foram registradas em mais de 100 espécies de teleósteos, muitas das quais são importantes espécies de peixes tropicais e subtropicais de aquários marinhos e aquicultura (HIRAZAWA et al. 2004; OGAWA et al. 2006; WHITTINGTON, 2012). Esse gênero compreende espécies de baixa especificidade de hospedeiro, apresentam órgãos de fixação anteriores, um de cada lado da região da cabeça, em forma de disco não dividido transversalmente, ciclo de vida direto, tempo de geração curto e ovos filamentosos e ambientalmente resistentes (Figura 2B), que se emaranham nas estruturas, causam dificuldades no manejo, pois um grande número de parasitos pode se tornar presente em um curto período de tempo causando grandes infestações no hospedeiro (BULLARD et al., 2000; HOAI e HUTSON, 2007; MILITZ et al., 2013; WHITTINGTON, 2004; OGAWA et al. 2006).

Figura 2. A) *Neobenedenia* sp. obtido de reprodutores de tainha do LAPMAR. Aumento 12.5 x. B) Ovos de *Neobenedenia* sp. obtidos após exposição *in vitro* com álcool de cereal (700 mg L<sup>-1</sup>, aumento 35x).



Fonte: Magnotti, 2019.

Estes parasitos já foram observados em superfícies externas do hospedeiro, incluindo narinas, olhos, cavidade bucal e nadadeiras (HIRAZAWA et al., 2010; OGAWA et al., 2006; TRUJILLO-GONZÁLEZ et al., 2015; WHITTINGTON e HORTON, 1996).

Os atuais métodos de manejo para os monogeneas encapsulados envolvem banhos dos peixes infectados em água oxigenada, formalina ou água doce (ERNST et al. 2002; OGAWA et al. 2006), que apenas alivia de forma temporária a infecção, pois remove os parasitas anexados aos hospedeiros (WHITTINGTON, 2012). No entanto esses métodos de tratamento são ineficazes na morte de embriões dentro dos ovos (SHARP et al. 2004; MILITZ et al. 2013) e a reinfeção pode ocorrer imediatamente após o tratamento do estoque. O banho continua sendo a prática de manejo mais comumente utilizada para infecções monogênicas e é amplamente utilizado no tratamento de epizootias causadas por *Gyrodactylus* spp. (BUCHMANN e KRISTENSSON, 2003; SCHELKLE et al. 2011).

### 1.1 QUIMIOTERÁPICOS

Na aquicultura, o uso de produtos químicos tem sido uma das formas de controlar e tratar doenças (PAHOR-FILHO, 2012; PAIXÃO et al., 2013; ANDRADE-PORTO et al., 2017). Entre os produtos mais utilizados está a formalina, uma solução aquosa saturada (37%) de formaldeído utilizada como antiparasitário, principalmente para o tratamento de protozoários, monogenéticos e de infestações de vermes presentes na pele e brânquias, além disso, tem efeito bactericidas, virucidas e fungicidas (SCHREIER et al. 1996; RACH et al. 1997).

Apesar da sua utilização ter sido aprovada pelo Food and Drugs Administration (FDA) para ser utilizada no controle de fungos, protozoários e parasitos externos (FDA, 1992 e 1998), pouco se sabe sobre as concentrações ideais, os níveis de tolerância para as diversas espécies de peixes, bem como o tempo de exposição e alterações teciduais e na homeostase dos animais expostos a formalina (JUNG et al., 2001; ANDRADE-PORTO et al., 2017), além dos possíveis resíduos que podem ser lançados no ambiente aquático.

Outros produtos químicos utilizados são o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que tem sido usado no tratamento e controle de doenças parasitárias e infecciosas (AFONSO et al., 2009) como os monogenoideas (SITÍA-BOBADILLA et al., 2006; HUTSON et al., 2007) e protozoários (HOWE et al., 1999; RACH et al., 2000) e infecções causadas por fungos (RACH et al., 2004) e bactérias (THOMAS-JINU e GOODWIN, 2004; AVENDAÑO-HERRERA et al., 2006) e o permanganato de potássio, um sal usado para o tratamento de infestações parasitárias por protozoários e monogenoideas e para o tratamento de doenças bacterianas das brânquias (FRANCIS-FLOID e KLINGER, 2003; KODAMA et al., 2004). Segundo Martins (2004), o permanganato de potássio tem-se mostrado eficaz no controle e diminuição do número

de Monogenoidea nas brânquias de peixes brasileiros cultivados. No entanto, o uso desse produto dependendo da concentração e tempo de exposição pode causar danos na pele e brânquias dos peixes (INTORRE et al., 2007).

Diante disso, busca-se alternativas para o tratamento dessas enfermidades e os fitoterápicos vem ganhando destaque na utilização do controle de parasitose. Dentre esses fitoterápicos, os óleos essenciais têm mostrado eficiência, são misturas complexas de numerosos compostos obtidos das plantas, possuem uma composição bastante diversificada, especialmente por compostos químicos terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanóides (CALSAMIGLIA et al., 2007). Entre os óleos essenciais usados na aquicultura podemos destacar os da família Verbenaceae, do gênero *Lippia* que abrange aproximadamente 200 espécies que crescem espontaneamente na América Central e do Sul, e na África (REIS et al., 2010). A família Verbenaceae compreende espécies com potencial industrial devido à sua composição aromática, em especial o gênero *Lippia*, que produz óleos essenciais, e são usados medicinalmente, como bem como para condimentar, nas indústrias cosmética e farmacêutica (JUDD et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014). As plantas constituintes desse gênero apresentam potente atividade antioxidante (DELACORTE SINGULANI et al., 2012), antifúngica (FUNARI et al., 2012), anti-helmíntica (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2008), antiprotozoária (ESCOBAR et al., 2010) e, anticarcinogênica (GOMIDE et al., 2013). Na aquicultura, esse gênero é amplamente estudado, apresentou efeito positivo como antimicrobiano (SOUZA et al., 2017) e antiparasitário (VALENTIM, 2017). Dentre as espécies deste gênero com diferentes atividades biológicas já comprovadas estão a *Lippia alba*, *Lippia organoides* e *Lippia sidoides*.

## 1.2 *Lippia alba*

*Lippia alba*, conhecida popularmente como melissa ou erva-cidreira, é um subarbusto com aproximadamente 1,5 metros de altura, sendo nativa de quase todas as regiões do Brasil. Cresce em solos arenosos, nas margens de rios, lagos e lagoas. Apresenta um crescimento rápido, estando presente em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (CORRÊA, 1992). É amplamente conhecida na América Latina, em razão de seus variados usos tradicionais, bem como de seu odor aromático ou propriedades medicinais (HENNEBELLE et al., 2008).

*L. alba* possui uma ampla variedade de usos tradicionais e atividades farmacológicas dentre os quais analgésico, anti-inflamatório, antipirético, sedativo, usado no tratamento de

doenças cutâneas, remédio para doenças gastrointestinais, tratamento de doenças hepáticas, antimicrobiano, antiviral, antiespasmódico, tratamento de doenças respiratórias, cistostático e anticonvulsivante (SACCOL, 2013). Na aquicultura o óleo essencial (OE) de *L. alba* já foi testado como: anestésico tendo sua atividade comprovada por Cunha et al. (2010); como antibacteriano Sutili et al. (2015); e já foram realizados testes com o OE na ração para peixes nos trabalhos de Saccol et al. (2013) e Souza et al. (2015). Além disso, para alguns organismos aquáticos o óleo essencial de *L. alba* tem demonstrado efeito anestésico, melhora na qualidade da água, os parâmetros fisiológicos e bioquímicos e das respostas antioxidantes (SALBEGO et al., 2017; SIMÕES et al., 2017; SOUZA et al., 2018; TONI et al., 2014). Efeitos positivos da adição dietética de OE *L. alba* foram encontrados no jundiá, *Rhamdia quelen*, no qual houve uma diminuição da peroxidação lipídica e um aumento nas reservas de lactato e glicogênio, além de melhorar a resposta antioxidante tecidual (SACCOL et al., 2013), e uma melhora na conversão alimentar e atividade imunológica na tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (SOUZA et al., 2018). O efeito genotóxico do óleo essencial de *L. alba* foi avaliado por Kampke et al. (2018) em tilápia do nilo em que a concentração 300 mg L<sup>-1</sup> não causou danos ao DNA. Saccol et al. (2013), avaliando efeito no crescimento, parâmetros metabólicos, sanguíneos e biomarcadores de estresse oxidativo da adição do óleo essencial de *L. alba* em *Rhamdia quelen*, e as concentrações usadas no experimento teve alterações nos parâmetros sanguíneos ou melhorias no crescimento, mas reduziu a peroxidação lipídica nos tecidos, aumentou as reservas de glicogênio e lactato, atuando como um antioxidante tecidual.

### 1.3 *Lippia origanoides*

*Lippia origanoides* Kunth ocorre na América Central (México, Guatemala, Cuba) e no norte da América do Sul, principalmente nas regiões amazônicas da Colômbia, Venezuela e Brasil, onde é comumente conhecida como “Salva-de-Marajó”, “Orégano-do-Monte” e “Alecrim-de-Tabuleiro” (PASCUAL et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2007; STASHENKO et al., 2010; SILVA et al., 2015). Foi classificado em cinco diferentes tipos, de acordo com os diferentes compostos principais presente em seu óleo essencial: A (p-cimeno, E-cariofileno,  $\alpha$ - e  $\beta$ - felandreno, limoneno,  $\alpha$ -humuleno e 1,8-cineol) com um citrino aroma; B (carvacrol) e C (timol) com o mesmo cheiro de “orégano”; D (1,8-cineol) com aroma fresco e canforado; e E (E-metil cinamato e E-nerolidol) com um sabor frutado-amadeirado que lembra canela, morango e madeira (RIBEIRO et al., 2014).

Estudos etnobotânicos mostram que esta é uma importante planta medicinal com usos terapêuticos e culinários para tratar doenças gastrointestinais, urogenitais, e problemas respiratórios, bem como usos antiespasmódico, anti-inflamatório, analgésico e antimalárico (OLIVEIRA et al., 2014, 2007; RIBEIRO et al., 2014; SOARES e TAVARES-DIAS, 2013; VÁSQUEZ e outros, 2014). Muitos estudos demonstraram as diferentes atividades biológicas in vivo e in vitro do óleo essencial de *L. origanoides* (SARRAZIN et al., 2015; ALMEIDA et al., 2016 ; HERNADES et al., 2017; SOARES et al., 2017; NEIRA et al., 2018), incluindo atividade antiparasitária contra ectoparasitas em peixes (SOARES et al., 2017) e na leishmaniose cutânea (NEIRA et al., 2018); efeitos antimicrobianos contra *Candida krusei*, *C. parapsilosis*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* (BETANCUR-GALVIS et al., 2011), as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739 (SARRAZIN et al., 2015) e *Salmonella choleraesuis* ATCC 35.640 (ALMEIDA et al., 2016), repelente (NERIO et al., 2009) e inseticida (TEIXEIRA et al., 2014), antioxidante e moderado potencial larvicida contra *Aedes aegypti* (MAR et al., 2018), inibidor de tirosinase (SILVA et al., 2017), e é utilizado como conservante alternativo em alimentos e em produtos farmacêuticos (HERNADES et al., 2017).

#### 1.4 *Lippia sidoides*

A espécie *L. sidoides*, conhecida como alecrim-pimenta, é uma espécie própria da vegetação do semiárido nordestino e é muito usada na indústria de perfumaria, alimentos e cosméticos (REIS, 2009). Além disso, é bastante utilizada na medicina popular na forma de chá ou tintura das folhas, raízes e talos; como antisséptico, antioxidante e antimicrobiano, entre outros (LORENZI e MATOS, 2008). Para o óleo essencial de *L. sidoides* foram descritas atividades antiparasitária e antimicrobiana para o tambaqui *C. macropomum* (MAJOLO et al., 2017; 2018; BATISTA et al., 2018).

Em virtude da concentração de timol, a *L. sidoides* apresenta um alto poder antimicrobiano, se mostrando eficaz na inibição do crescimento de *Streptococcus* sp. e *Candida albicans* (BOTELHO et al., 2007), anti-helmíntico (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007), antifúngico (SIQUEIRA et al., 2011), além de possuir propriedades anti-inflamatórias (MONTEIRO et al., 2007). Hashimoto et al. (2016) avaliaram a ação antiparasitária da *L. sidoides* contra os monogenoídeos *Cichlidogyrus tilapiae*, *Cichlidogyrus thurstonae*, *Cichlidogyrus halli* e *Scutogyrus longicornis*, a qual apresentou efeito benéfico no tratamento, embora não sendo indicado seu uso em virtude das alterações hematológicas observadas.

### 1.5 *Mentha piperita*

Outro fitoterápico utilizado como óleo essencial promissor na aquicultura destaca-se o do gênero *Mentha*, pertencente à família Lamiaceae, está distribuído em áreas tropicais e temperadas do mundo e já foram descritos cerca de 240 gêneros e 7200 espécies, e no Brasil estão presentes 46 gêneros e 524 espécies nativas ou introduzidas (HARLEY, 2012). No Brasil é popularmente conhecida como mentas ou hortelãs, utilizadas para fins medicinais devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, espasmódicas, carminativas e antioxidantes (STANISAVLJEVIC et al., 2014). 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).

Embora seja nativa da Europa, é cultivada em todo mundo, devido ao seu grande uso na alimentação, em produtos medicamentosos e em cosméticos (ISCAN 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 (YDEGARINIA et al., 2006). Também apresentam propriedades antiinflamatórias, antiespasmódica, antiemética e analgésica (TAMPIERI et al., 2005; BETONI et al., 2006). O óleo essencial de *M. piperita* já apresentou anestésicas, antiespasmódicas e estomático-estimulantes (LORENZI e MATOS, 2008). É considerado um composto terapêutico usado no tratamento de diversos sinais clínicos e doenças, incluindo parasitoses. Vidal et al. (2007) demonstraram que o óleo essencial de *M. piperita* apresentou atividade anti-trofozoítos de *Giardia duodenalis* (syn. *G. lamblia*), enquanto esse óleo também apresentou atividades antiparasitária e antimicrobiana para *C. macropomum* (MAJOLO et al., 2018; FERREIRA et al., 2019).

### 1.6 OBJETIVOS

### 1.6.1 Objetivos geral

Avaliar o uso de óleos essenciais e quimioterápicos como antiparasitário de *Neobenedenia* sp. em tainhas *Mugil Liza*.

### 1.6.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração antiparasitária *in vitro* dos óleos essenciais de *L. alba*, *L. origanoides* e *L. sidoides*, *Mentha Piperita*, permanganato de potássio, formol e peróxido de hidrogênio para o *Neobenedenia* sp.
- Avaliar o desempenho zootécnico de juvenis de *M. Liza* alimentada com ração suplementada com o óleo essencial de *L. origanoides*;
- Determinar os índices parasitários em juvenis de tainha *M. Liza* alimentadas com ração suplementada com o óleo essencial de *L. origanoides*;
- Avaliar os parâmetros hematológicos e glicose de juvenis de tainha alimentados com ração suplementada com óleo essencial de *L. origanoides*

## 1.7 FORMATAÇÃO DOS CAPÍTULOS DA TESE

Esta tese está dividida em dois artigos científicos. O artigo 1 será submetido ao periódico *Aquaculture*, e o artigo 2 será destinado à submissão ao periódico *Boletim do instituto de Pesca*.



## 2 ARTIGOS

### 2.1 ARTIGO 1

#### **Uso de fito e quimioterápicos para controle de *Neobenedenia* sp. em tainha *Mugil liza*: ensaios *in vitro***

Cleize Sales da Silva<sup>1\*</sup>, Elenice Martins Brasil<sup>1</sup>, Filipe dos Santos Cipriano<sup>1</sup>, Caio Magnotti<sup>1</sup>, Vanessa Martins da Rocha<sup>1</sup>, William Eduardo Furtado<sup>2</sup>, Francisco Célio Maia Chaves<sup>3</sup>, Maurício Laterça Martins<sup>2</sup>, Vinicius Ronzani Cerqueira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LAPMAR - Laboratório de Piscicultura Marinha, Departamento de Aquicultura, Faculdade de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>2</sup>AQUOS - Laboratório de Saúde de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Faculdade de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>3</sup>Embrapa Amazônia Ocidental, Rod. AM 10, km 29 s / n, 69010-970, Manaus, Amazonas, Brasil.

**\*Autor correspondente:** Cleize Sales da Silva. LAPMAR - Laboratório de Piscicultura Marinha, Departamento de Aquicultura, Faculdade de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil

#### **Declaração de disponibilidade dos dados**

Os dados que apoiam as conclusões deste estudo estão disponíveis com o autor correspondente, mediante solicitação.

## Resumo

As práticas intensivas e semi-intensivas de produção vêm causando aumento na incidência de doenças e entre os agentes causadores os monogenoideos causam várias alterações epiteliais e hematológicas nos hospedeiros. As medidas normalmente utilizadas para controle de Monogenea consistem no uso de fito e quimioterápicos. O objetivo deste estudo foi encontrar a concentração ideal de fitoterápicos e quimioterápicos, para a mortalidade dos parasitos, no menor tempo possível. Os parasitos foram coletados de reprodutores de tainhas. Foram realizados testes *in vitro* com soluções de óleos essenciais *Lippia alba*, *L. origanoides*, *L. sidoides* e *Mentha piperita* (100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 mg L<sup>-1</sup>), formol (100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 mg L<sup>-1</sup>), permanganato de potássio (1,5, 2,5, 3,5, 4 e 5 mg L<sup>-1</sup>), peróxido de hidrogênio (90, 180, 200, 250, 300 e 350 mg L<sup>-1</sup>) e salinidades (0, 5 e 10 mg L<sup>-1</sup>). Os tratamentos 100% eficazes ocorreram nas concentrações de 600 e 700 mg L<sup>-1</sup> de óleo de *L. origanoides* (1 min) e 350 mg L<sup>-1</sup> (3 min) de peróxido de hidrogênio. Esse estudo mostrou diferenças na dose-resposta dos produtos testados para *Neobenedenia* parasito da tainha e estudos *in vivo* com as concentrações devem ser realizadas. Conclusão: o que seria mais indicado para um teste *in vivo*?

**Palavras-chave:** Piscicultura marinha, fitoterápico, tratamento, Monogenea

## Summary

Intensive and semi-intensive production practices have been causing an increase in the incidence of diseases and, among the causative agents, Monogenea cause several epithelial and hematological alterations in the hosts. The measures normally used to control Monogenea consist of the use of herbal and chemotherapeutic agents. The objective of this study was to find the ideal concentration of herbal and chemotherapeutic agents for parasite mortality in the shortest possible time. The parasites were collected from mullet breeders at the Marine Pisciculture Laboratory at the Federal University of Santa Catarina. *In vitro* tests were performed with solutions of *Lippia alba*, *L. origanoides*, *L. cidoides* and *Mentha piperita* (100, 200, 300, 400, 500, 600 and 700 mg L<sup>-1</sup>), formaldehyde (100, 200, 300, 400, 500, 600 and 700 mg L<sup>-1</sup>), potassium permanganate (1.5, 2.5, 3.5, 4 and 5 mg L<sup>-1</sup>), hydrogen peroxide (90, 180, 200, 250, 300 and 350 mg L<sup>-1</sup>) and salinities (0, 5 and 10 mg L<sup>-1</sup>). The 100% effective treatments occurred at concentrations of 600 and 700 mg L<sup>-1</sup> of *L. origanoides* (1 min) and 350 mg L<sup>-1</sup> (3 min) of hydrogen peroxide. This study showed differences in the dose-response of the products tested for *Neobenedenia* parasite of the mullet and *in vivo* studies with the concentrations must be carried out.

**Keywords:** Marine fish farming, herbal medicine, treatment, Monogenea

### 2.1.1 Introdução

A tainha (*Mugil liza*) (Valenciennes, 1836), pertence à família Mugilidae, ordem Perciformes e classe Actinopterygii e é encontrada desde o Caribe até a Argentina (Durand et al., 2012; Lemos et al., 2014; Menezes, 2010). Os adultos habitam águas marinhas e lagoas de água salobra, ocasionalmente podem ser encontrados em ambientes de água doce, porém não nas partes altas dos rios (Crosetti et al., 2015), sendo considerados catádromos (Fischer et al., 2011). Alguns estudos apontam que a tainha possui características favoráveis para a piscicultura por ser eurialina e euritérmica, tolerando altas variações na salinidade e temperatura, além de possuir hábito alimentar planctófago quando juvenil e iliófago quando adulto, o que favorece a adaptação dos peixes a uma dieta inerte e possui ciclo reprodutivo dominado (Carvalho et al., 2019; Cerqueira et al., 2017; Miranda filho et al., 2010).

No entanto, as práticas intensivas e semi-intensivas de produção aquícola vêm causando aumento na incidência de doenças, resultando na perda parcial ou total da produção de peixes (Bondad-Reantaso et al., 2005). Muitos fatores, incluindo superpopulação, manejo inadequado, má qualidade da água e nutrição inadequada são responsáveis por criar um estado de estresse que leva à imunossupressão em peixes e, assim, aumentam a susceptibilidade a doenças (Cabello, 2006; Reverter et al., 2014). Entre os agentes causadores de doenças em peixes podemos destacar os ectoparasitos da classe Monogenea que em grande número, causam várias alterações epiteliais e hematológicas nos hospedeiros (Araújo et al., 2009; Tavares-dias et al., 2008), predispondo o hospedeiro a infecções secundárias e muitas vezes levando a uma mortalidade elevada dentro de um lote (Huang et al., 2013; K. Ogawa, 2015). Na América do Sul, os Monogenea de peixes marinhos são representados por 244 espécies pertencentes a 32 famílias (Kohn et al., 2016). No Brasil, foram registradas para *Mugil liza* no litoral sul do Rio Grande do Sul a espécie *Ligophorus uruguayense* (Siquier & Núñez, 2009) e *Solostamenides platyorchis* (Pahor-Filho et al., 2012), encontradas nas brânquias. No entanto, o Monogenea *Neobenedenia pacifica* foi registrado para Mugilideos em La Paz, Baixa Califórnia, México (Bravo-hollis, 1971). O gênero *Neobenedenia*, pertencente à família Capsalidae, é um ectoparasito de peixes marinhos frequentemente encontrado nos cultivos (Whittington, 2004). Esse gênero compreende espécies de baixa especificidade de hospedeiro, ciclo de vida direto, alta fecundidade e ovos ambientalmente resistentes (Bullard et al., 2000; Hoai & Hutson, 2007; Miltz et al., 2013; Kazuo Ogawa et al., 2006; Whittington, 2004). Estes parasitos já foram observados em superfícies externas do hospedeiro, incluindo narinas, olhos, cavidade bucal e nadadeiras (Hirazawa et al., 2010; Kazuo Ogawa et al., 2006; Trujillo-González et al., 2015; Whittington & Horton, 1996).

Dentre as medidas terapêuticas citadas na literatura para o controle de *Monogenea* está o uso de quimioterápicos, dentre os quais destacam-se a formalina (Pahor-Filho et al., 2012), permanganato de potássio (Umeda et al., 2006), praziquantel (Forwood et al., 2013; Sitjà-Bobadilla et al., 2006) e peróxido de hidrogênio (Benavides-González et al., 2015; Bowker et al., 2012; Hirazawa et al., 2016). No entanto, esses produtos nem sempre são eficazes a todos os patógenos, além de apresentarem riscos de contaminação ao meio ambiente, assim como alta toxicidade aos peixes e seres humanos (Cruz et al., 2004). Os fitoterápicos estão entre os produtos mais promissores, pois atingem somente a espécie alvo e são biodegradáveis, causando menos danos ao meio ambiente, podendo ser alternativas mais viáveis (Chagas, 2004).

Dentre os fitoterápicos utilizados no controle de parasitose, os óleos essenciais têm ganhado destaque, são misturas complexas de numerosos compostos obtidos das plantas, possuem uma composição bastante diversificada, especialmente por compostos químicos terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanóides (Calsamiglia et al., 2007). A utilização de fitoterápicos para o tratamento e controle de enfermidades em peixes já foi testada *in vitro* e *in vivo* para diferentes espécies (Tavares-Dias, 2018). Dos que já foram testados como antiparasitários em peixes temos: *Lippia organoides* (Soares et al., 2017); *L. sidoides* (Hashimoto et al., 2016), *L. alba* (Soares et al., 2016) e a *Mentha piperita* (Hashimoto et al., 2016; Malheiros et al., 2016).

Os testes *in vitro* compõem uma etapa preliminar de um procedimento terapêutico, contribuindo para melhor resposta nos testes de eficácia em hospedeiros (Cruz et al., 2005; Forwood et al., 2014; Park et al., 2014) e apresentam rapidez de execução e baixo custo, podendo ser utilizados na triagem de óleos essenciais e seus compostos bioativos (Githiori et al., 2006). Isso garante maior margem de segurança para o uso do produto, pois, muitas vezes, a dosagem terapêutica para o organismo alvo (patógeno) pode ser próxima a dosagem letal para o organismo não alvo (peixe) (Cruz et al., 2005; Tarkhani et al., 2012). No entanto, para quimioterápicos, são poucos os trabalhos na literatura que descrevem a realização dos testes *in vitro* antes dos testes *in vivo*, ao contrário daqueles com fitoterápicos (Costa et al., 2020).

Diante disso, o objetivo deste estudo foi encontrar a concentração ideal de óleos essenciais de *Lippia* e quimioterápicos de uso convencional, para que os parasitos tenham imobilização total, no menor tempo possível. Além disso, esses dados irão contribuir para futuros trabalhos para o controle e tratamento *in vivo* do *Neobenedenia* sp. em *M. liza*.

## 2.1.2 Material e Métodos

### 2.1.2.1 Material Biológico

Os parasitos foram obtidos de 15 reprodutores de tainhas F1 com peso médio de 900,4 g ( $\pm 96,99$  g) e comprimento médio de 45,67 cm ( $\pm 1,50$  cm). Os peixes foram criados no Laboratório de Piscicultura Marinha, da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (27° S), Brasil. Os indivíduos foram obtidos de desova única seguindo os procedimentos de indução à desova e larvicultura descritos por Cerqueira et al. (2017) e Carvalho et al. (2019). Os juvenis foram mantidos com biomassa máxima de 3 kg/m<sup>3</sup> em tanques outdoor de 10 m<sup>3</sup>, com renovação contínua de água oceânica (250%) e aeração constante com mangueira microporosa nas terminações (Magnotti & Cipriano, 2020). Os peixes durante todo o período foram alimentados quatro vezes ao dia até a saciedade aparente (Calixto da Silva et al., 2020), com ração comercial 1,3 a 1,5 mm (45% proteína bruta, 9,0% extrato etéreo) até atingirem 100 g, e posteriormente 2,5 mm (45% proteína bruta, 8,0% extrato etéreo).

Os peixes apresentavam manchas brancas na superfície do corpo, principalmente próximo a nadadeira dorsal. No momento da coleta dos parasitos, foi possível observar que alguns animais com infestações de *Monogenea* apresentavam hemorragias nas laterais do corpo e região abdominal. Os peixes foram amostrados aleatoriamente (2 indivíduos por coleta) e eutanasiados por secção medular para coleta dos parasitos por meio de raspagem do tegumento. A confirmação da presença dos parasitos foi feita com auxílio de uma lupa (aumento de 0.8x, Leica EZ4HD), mesmo sendo possível observação a olho nu. Durante o experimento foram monitorados os parâmetros de qualidade de água do tanque de manutenção dos reprodutores pH:  $7,22 \pm 0,16$  (pH10A, Ysi-EcoSense, CN), oxigênio dissolvido:  $6,9 \pm 0,58$  mgL<sup>-1</sup> e temperatura:  $24^\circ \text{C} \pm 0,45$  (YSI 55, Yellow Spings, OH, USA) valores de acordo com o conforto da espécie (Cerqueira et al., 2017).

Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC/nº 1139170919).

### 2.1.2.2 Composição química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram obtidos a partir das folhas das plantas cultivadas e processadas no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Manaus-AM, Brasil. Após coleta das folhas pela manhã, elas foram secas em estufa de circulação contínua a 45 °C por 48 h e a extração dos óleos essenciais

foi realizada por processo de hidro destilação em aparelho tipo Clevenger (Matos, 1996; Silveira et al., 2012).

A composição química dos óleos *L. alba*, *L. origanoides* e *L. sidoides* e *M. piperita* foi determinada pelo método de cromatografia gasosa com equipamentos Agilent 6890 e detector de massas seletivo Agilent 5973N. A separação dos componentes foi realizada em uma coluna capilar HP5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) com temperatura de 60 °C a 240 °C e variação de 3 °C  $\text{m}^{-1}$ . O volume de 1,0 microlitro de uma solução contendo 1% de cada óleo foi injetado no divisor de fluxo na proporção de 1: 100 e mantido a 250 °C. A quantificação relativa (%) dos componentes dos óleos foi realizada no cromatógrafo a gás Agilent 6890N, equipado com um detector de ionização de chama, mantido a 280 °C, e por uma coluna capilar HP5 (30 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) com o uso de hidrogênio (1,5  $\text{mL min}^{-1}$ ) como gás carreador. A identificação dos constituintes de cada óleo foi realizada comparando os espectros de massa obtidos pela biblioteca de espectros da 6ª edição de Wiley e comparando o índice de retenção calculado de cada componente com os dados da literatura. O cálculo do índice foi realizado pela injeção de uma série de n-alcenos nas mesmas condições analíticas utilizadas para os demais óleos (Adams, 2007).

### 2.1.2.3 Teste *in vitro* dos óleos essenciais e quimioterápicos

Foi realizado um pré-teste dos óleos essenciais nas concentrações de 20, 40, 60 e 80  $\text{mg L}^{-1}$  para determinar a eficácia contra parasitos *Monogenea*, com base em estudos semelhantes na literatura para espécies dulcícolas (Malheiros et al., 2016; Soares et al., 2016). Nestas concentrações não foi possível determinar a eficácia dos óleos, pois os parasitos não morreram ao ficarem mais de 8 h expostos. Dessa forma, as concentrações experimentais foram estabelecidas acima de 80  $\text{mg L}^{-1}$ .

Quanto aos fitoterápicos, os óleos essenciais foram diluídos em álcool de cereais a uma solução estoque de 10% e em seguida foram preparadas as seguintes concentrações e tratamentos: controle com água do tanque de manutenção dos peixes (35 de salinidade), controle com álcool de cereais, e os óleos de *Lippia alba*, *L. origanoides*, *L. sidoides* e *Mentha piperita* com 100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700  $\text{mg L}^{-1}$ .

Para o tratamento com quimioterápicos, o formol foi diluído com água do tanque de manutenção dos peixes (35 de salinidade) para obter uma solução estoque de 10% semelhante aos fitoterápicos. O formol utilizado possuía concentração de 37%, pois é o mais comum encontrado no mercado e considerou-se como um produto de concentração a 100%. Em seguida, foram preparadas as seguintes concentrações e tratamentos: controle com água do

tanque de manutenção e formol (100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 mg L<sup>-1</sup>). O permanganato de potássio foi diluído com água de manutenção do tanque) para obter uma solução estoque de 4% e em seguida foram preparadas as seguintes concentrações e tratamentos: controle com água do tanque de manutenção e permanganato de potássio (1,5, 2,5, 3,5, 4 e 5 mg L<sup>-1</sup>). O peróxido de hidrogênio 37% foi diluído com água de manutenção do tanque e preparado nas seguintes concentrações e tratamentos: Controle com água do tanque de manutenção e peróxido de hidrogênio (90, 180, 200, 250, 300 e 350 mg L<sup>-1</sup>). O tratamento com salinidade foi realizado após diluição da água do tanque de manutenção dos peixes em água doce da rede pública declorificada. Em seguida, foram preparadas as seguintes concentrações e tratamentos: controle com água do tanque de manutenção (35 mg L<sup>-1</sup>) e salinidades 0, 5 e 10 mg L<sup>-1</sup>.

Os tratamentos foram realizados em placa de poliestireno, de seis poços para cultura de células e tecidos, fundo chato com superfície lisa e borda elevada (Kasvi, 2006), em triplicata, contendo 10 parasitos em cada poço. As placas foram observadas após 5, 10 e 15 min, e depois a cada 30 min para quantificação de parasitos mortos e observações comportamentais, sendo considerada a morte parasitária com ausência de movimento após estímulo com uma agulha de insulina (13 mm x 0,25 mm).

#### 2.1.2.4 Identificação dos parasitos

Dois peixes foram rapidamente anestesiados em solução de benzocaína (50 mg L<sup>-1</sup>) e eutanasiados por secção medular para coleta, por meio de raspagem do tegumento. Depois de retirados, os parasitos foram banhados em água a 55 °C e em seguida fixados em formalina a 5%. Os parasitos foram montados em meio Hoyer's, entre lâmina e lamínula, para a observação de estruturas esclerotizadas específicas e identificadas de acordo com Yamaguti (1963) como sendo *Neobenedenia* sp.

#### 2.1.2.5 Análise estatística

Para determinar a melhor concentração de cada fitoterápico, quimioterápico e salinidade, a variável dependente “tempo até a mortalidade total do parasito (min.)” foi submetida à análise de regressão linear de primeira ordem. Todas as análises foram feitas no programa SigmaStat 4.0.

### 2.1.3. Resultados

#### 2.1.3.1 Composição química dos óleos essenciais

Os resultados da análise da composição química dos óleos essenciais de *L. origanoides*, *L. sidoides*, *L. alba* e *M. piperita* são mostrados nos Apêndices 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Para os componentes químicos de *L. origanoides*, 100% foram quantificados e 92,90% foram identificados. Os componentes mais abundantes desse OE foram identificados como carvacrol (49,7%), timol (9,9%),  $\gamma$ -terpineno (11,6%) e linalol (2,8%). Em *L. sidoides*, 100% foram quantificados e 99,28% identificados. Os componentes com as maiores porcentagens foram timol (75,4 %), p-cimeno (7,3 %), (E) -caricofileno (4,3%) e  $\gamma$ -terpineno (3 %). Em *L. alba*, 100% dos componentes foram quantificados e 96,7% dos foram identificados. Os principais constituintes foram carvona (61,7%), limoneno (17,5%), mirceno (3,5%) e germacreno D (2,7%). Para *M. piperita*, 100% dos componentes foram quantificados e 99,8% foram identificados. Os principais componentes foram mentol (30,5%), acetato de mentila (14,5%), pulegona (14,2%) e mentona (12,9%).

#### 2.1.3.2 Teste in vitro dos óleos essenciais

Com a utilização dos óleos essenciais os melhores resultados, com eliminação de todos os *Neobenedenia* sp. no menor intervalo de tempo, foram obtidos com *L. origanoides*, *L. sidoides* e *M. piperita*. Os tratamentos com o óleo de *L. alba* foram de baixa eficácia, sem mortalidade dos parasitos em nenhuma das concentrações testadas, mesmo submetidos por mais de oito horas ao produto. Os tratamentos que apresentaram 100% de eficácia em menor tempo foram nas concentrações de 600 e 700 mg L<sup>-1</sup> de *L. origanoides* (1 min), seguido de *L. sidoides* 700 mg L<sup>-1</sup> (4 min) e *M. piperita* 700 mg L<sup>-1</sup> (9 min). Os parasitos tratados com *L. origanoides* apresentaram os menores tempos de mortalidade. Na concentração de 200 mg L<sup>-1</sup>, foi possível observar a mortalidade total dos parasitos em menos de 30 min de exposição ao produto (Figura 3A). Ao entrar em contato com o óleo, os parasitos apresentaram imobilização total com 1 min de exposição nas concentrações maiores, sem responder a nenhum estímulo por pelo menos 60 min de monitoramento, quando estimulados com agulha. Os parasitos se desprendiam da placa, contraíam o corpo de forma a ficarem enrolados ou em forma de concha, adquiriam coloração esbranquiçada e após 20 min de monitoramento alguns indivíduos voltavam à forma relaxada, após a morte.

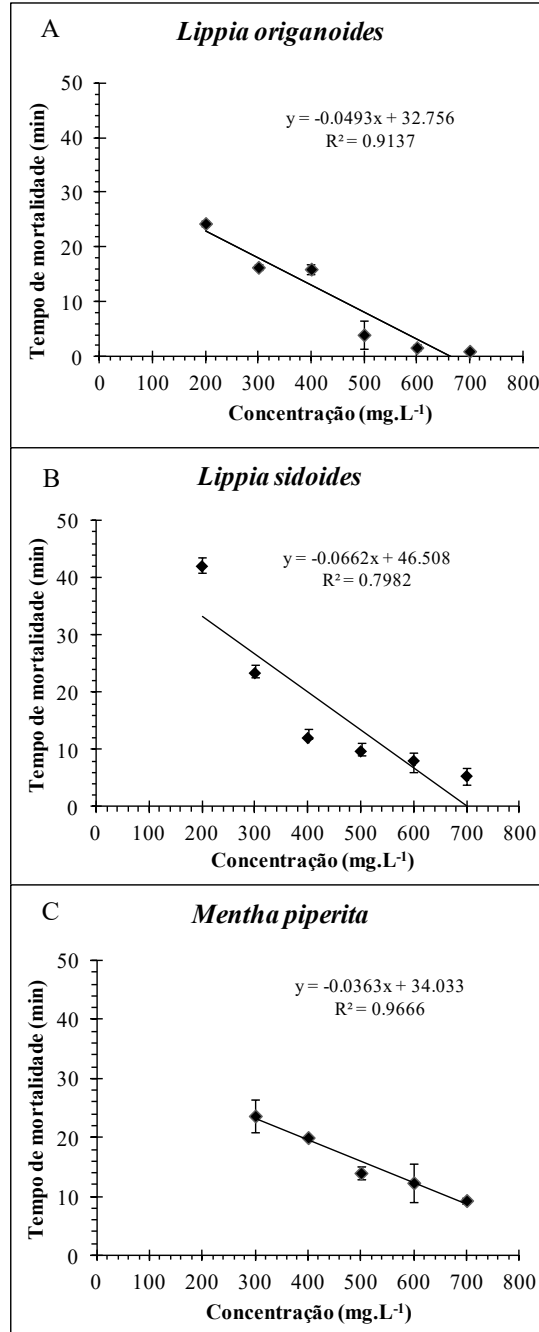


O óleo essencial de *L. sidoides* foi o segundo tratamento mais eficaz, no entanto, na concentração de 200 mg L<sup>-1</sup> o tempo necessário (> 40 min) foi superior aos demais tratamentos (Figura 3B). Quando em contato com o óleo, os parasitos apresentaram imobilização total com 4 min na maior concentração, sem responder a estímulos por aproximadamente 60 min de monitoramento. Além disso, foi possível observar que após a mortalidade, os indivíduos apresentaram comportamento semelhante ao tratamento anterior.

O óleo de *M. piperita* foi o terceiro mais eficaz. Houve pouca variação no tempo de eficácia do produto, com 27 min nas concentrações de 300 mg L<sup>-1</sup> e 9 min nas concentrações 700 mg L<sup>-1</sup> (Figura 3C). Os parasitos não responderam a nenhum estímulo com agulha por aproximadamente 60 min de monitoramento, após imobilização. Além disso, foi possível observar que os indivíduos apresentaram contração e redução dos movimentos nas maiores concentrações, voltando ao estado relaxado com 30 min de monitoramento.

Os tratamentos com *L. alba* apresentaram os piores resultados, não sendo observada mortalidade dos parasitos em nenhuma das concentrações testadas. Os parasitos não se desprendiam da placa e sua imobilização foi parcial, pois respondiam ao estímulo com agulha. Da mesma forma, a concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> dos demais óleos de 200 mg L<sup>-1</sup> de *M. piperita* não causaram mortalidade dos Monogenea. Mesmo com tempo de exposição superior a oito horas, foi observado que todos os indivíduos continuaram vivos.

Figura 3. Tempo de mortalidade total de *Neobenedenia* sp. de acordo com as concentrações de *Lippia origanoides* (3A), *Lippia sidoides* (3B) e *Mentha piperita* (3C), no teste in vitro. Os resultados estão expressos em regressão linear, utilizando a média de 3 repetições (n = 10 *Neobenedenia* sp. por réplica) O tratamento com álcool de cereais, até na concentração de 700 mg L<sup>-1</sup>, não causou mortalidade dos Monogenea durante oito horas de exposição testado.



### *2.1.3.3 Teste in vitro com formol, peróxido de hidrogênio, permanganato de potássio e cloreto de sódio*

Os melhores resultados foram obtidos nas maiores concentrações dos tratamentos com quimioterápicos, exceto a salinidade que apresentou o melhor resultado com 0 mg L<sup>-1</sup> (água doce).

O peróxido de hidrogênio na concentração de 350 mg L<sup>-1</sup> (3 min) foi o mais eficaz contra os parasitos, seguido do permanganato de potássio a 5 mg L<sup>-1</sup> (7 min), da salinidade a 0 mg L<sup>-1</sup> (16 min) e formol a 700 mg L<sup>-1</sup> (20 min).

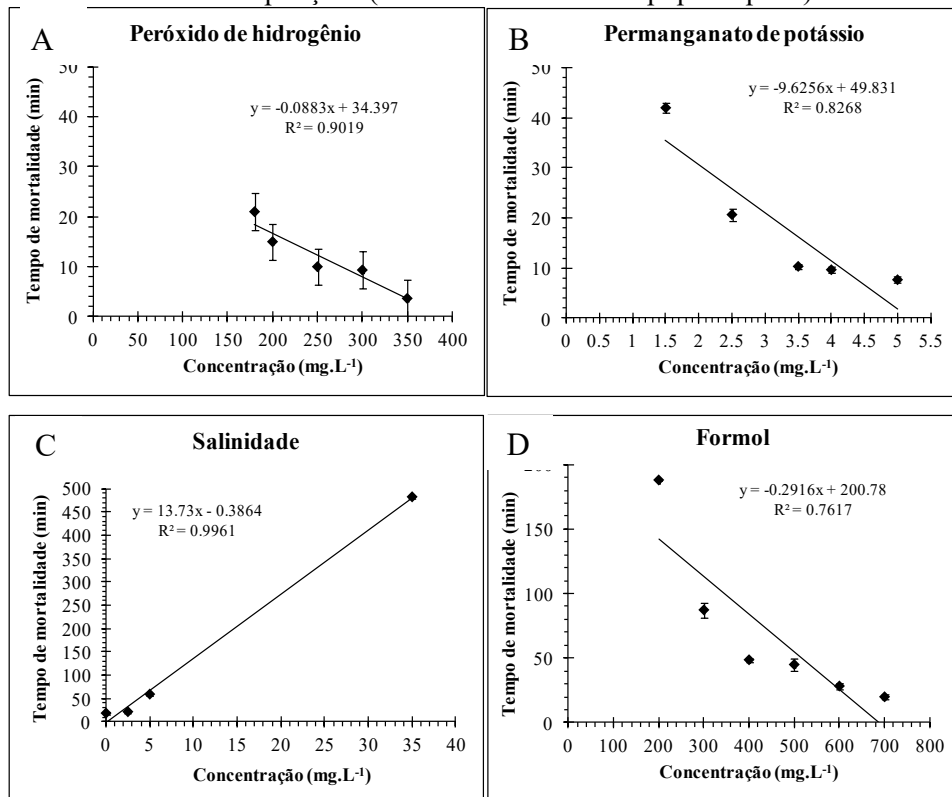
O permanganato de potássio, com exceção da menor concentração, obteve resultados semelhantes ao peróxido de hidrogênio com mortalidade de todos os parasitos em 7 min na maior concentração (Fig 4A e 4B). Após imobilização, os parasitos não responderam a estímulos com agulha por aproximadamente 60 min de monitoramento. Além disso, se desprendiam da placa, apresentavam contração lenta e, na medida que se aumentou a concentração, absorviam o produto e modificavam sua coloração. Outro efeito desse produto no parasito foi a fragilidade em que este se encontrava após a morte, pois quando tocado pela agulha o parasito facilmente se quebrava.

O peróxido de hidrogênio foi eficaz em todas as concentrações. Quando em contato com o produto os parasitos apresentaram imobilização total com 3 min na maior concentração de 350 mg L<sup>-1</sup>, e apresentaram comportamento semelhante ao tratamento anterior, com exceção do corpo enrugado.

A mortalidade total em água doce (0 mg L<sup>-1</sup>) ocorreu em 16 min após a exposição. Os parasitos se desprendiam da placa, apresentavam contração rápida e mudavam da coloração característica para esbranquiçada. O tratamento com 35 mg L<sup>-1</sup>, água do tanque de manutenção, foi considerado como controle negativo do experimento. Nessa concentração, os parasitos sobreviveram por mais de 480 min (Fig. 4C).

O formol foi o quimioterápico que apresentou os maiores tempos para a mortalidade dos parasitos. O menor tempo ocorreu no tratamento de 700 mg L<sup>-1</sup> (20 min). Concentrações abaixo de 600 mg L<sup>-1</sup> apresentaram tempos superiores a 40 min para a mortalidade total. Quando em contato com o químico os parasitos apresentaram contrações lentas, coloração esbranquiçada e relaxamento 30 min após a morte (Fig. 4D).

Figura 4. Tempo de mortalidade total de *Neobenedenia* sp. de acordo com as concentrações de Peróxido de Hidrogênio (4A), Permanganato de potássio (4B), Salinidade (4C) e Formol (4D), no teste *in vitro*. Os resultados são expressos em regressão linear, utilizando a média e desvio padrão de 3 repetições (n = 10 *Neobenedenia* sp. por réplica).



## 2.1.4. Discussão

### 2.1.4.1 Teste *in vitro* com óleos essenciais

A análise bioquímica dos OE utilizados neste estudo indicou que dois dos principais constituintes majoritários para *L. origanoides* foram carvacrol e timol; *L. sidoides* timol e p-cimeno; *L. alba* carvona e limoneno e *M. piperita* mentol e acetato de mentila. Resultados semelhantes aos de *L. origanoides* foram relatados anteriormente por diversos autores (Morais et al., 2014; Sarrazin et al., 2015; Teles et al., 2014; Vicuña et al., 2010).

Nos resultados da cromatografia gasosa do óleo essencial de *L. origanoides* descritos por Queiroz et al. (2014), o timol foi o principal agente bacteriano presente na extração das folhas dessa espécie (48,70%). Entretanto, verificou-se também a presença, em pequena quantidade do carvacrol (1,14%), cuja atividade antimicrobiana, contra fungos e bactérias foi constatada por Gomes et al. (2011). O principal constituinte existente na *M. piperita* é o mentol, que é um monoterpeno cíclico responsável por suas propriedades medicinais (Kamatou et al., 2013), esse componente possui efeito anestésico nos peixes (Hashimoto et al., 2016; Pádua et

al., 2010) e a dose recomendada para esses animais, com respiração branquial, é de até 60 mg L<sup>-1</sup> de mentol (Pádua et al., 2010).

No ensaio *in vitro*, o óleo de *L. origanoides* foi eficaz contra o Monogenea *Neobenedenia* sp. em quase todas as concentrações testadas. Soares et al. (2017) constatou que concentrações de 160 e 320 mg L<sup>-1</sup> tiveram eficácia contra os Monogeneas de *Colossoma macropomum*. Recentemente, demonstrou-se que o OE de *L. origanoides*, com uma composição semelhante à utilizada no presente estudo, obteve concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de 2.5 mg mL<sup>-1</sup> contra *Aeromonas hydrophila* (Majolo et al., 2017). Esses autores sugerem que o mecanismo de ação do óleo pode estar associado à ruptura da membrana celular e liberação subsequente de lipossacarídeo, levando a um aumento na permeabilidade ao trifosfato de adenosina. No presente estudo, os compostos majoritários de *L. origanoides* foram carvacrol e timol, é possível que eles estejam atuando de forma sinérgica na parede celular do Monogenea, rompendo as células e interferindo na mobilidade dos indivíduos com consequente mortalidade. O carvacrol demonstrou ter a capacidade de causar ruptura da membrana de *A. hydrophila*, causando morte bacteriana e reduzindo a mortalidade do *Ictalurus punctatus*, no entanto, é possível que esse composto esteja atuando em conjunto com outros compostos do óleo essencial (Sousa et al., 2015; Zheng et al., 2009). Por outro lado, foi comprovado que alterações cuticulares e possível neurotoxicidade causada pelo acetato de carvacrila e carvacrol podem interferir na permeabilidade da cutícula e motilidade, dificultando a manutenção da homeostase em nematóides *Haemonchus contortus* (Andre et al., 2016).

As maiores concentrações do óleo essencial de *L. sidoides* foram eficazes contra o Monogenea *Neobenedenia* sp. Hashimoto et al. (2016) relataram que 160 mg L<sup>-1</sup> desse óleo causou a completa mortalidade em Monogenea de *Oreochromis niloticus*, em aproximadamente 2 min, enquanto Soares et al. (2017) registrou 100% de atividade anti-helmíntica após 10 min na concentração 320 mg L<sup>-1</sup> contra Monogenea de *C. macropomum*. O principal constituinte de *L. sidoides* no presente estudo foi o timol, compreendendo 75,4% da composição. É provável que esse composto esteja atuando na permeabilidade das células do Monogenea e interferindo na transferência de ânions ou cátions. A ação do timol e do carvacrol sobre protozoários pode estar relacionada à inibição da síntese do ergosterol, causando um aumento na permeabilidade celular e a perda de cátions tais como K<sup>+</sup> (Escobar et al., 2010; Morais et al., 2014). Outros estudos demonstraram que a toxicidade do timol e carvacrol estão relacionados com os efeitos deletérios destes monoterpenos sobre as células, uma vez que causam desorganização na membrana celular (Medeiros et al., 2011). Enquanto, os óleos essenciais de *Thymus vulgaris*,

também ricos em timol e carvacrol, ocasionaram danos à cutícula e aparelho digestivo das larvas de *Anisakis* (Giarratana et al., 2014).

A *M. piperita* teve como compostos majoritários o mentol e o acetato de mentila. As maiores concentrações desse óleo foram eficazes contra o Monogenea *Neobenedenia* sp. Hashimoto et al. (2016) registraram 100% de eficácia da *M. piperita* na concentração de 320 mg L<sup>-1</sup> para Monogenea de *Oreochromis niloticus*. Hirazawa et al. (2000) também constataram a eficácia *in vitro* da *M. piperita* contra o Monogenea *Hetebothrium okamotoi* e observou que os parasitos apresentaram rápida contração do haptor e corpo nas maiores concentrações quando comparados com os tratamentos quimioterápicos. Por outro lado, Militz et al. (2013) demonstraram que quantidades mínimas de *Allium sativum* (<16 µL L<sup>-1</sup>) permitiram reduções significativas no sucesso de incubação de ovos (5% de sucesso), reduziram drasticamente a sobrevivência de oncomiracídios (100% de mortalidade em 2 h) e o sucesso de infecção (11% de sucesso) de *Neobenedenia* sp. em *Lates calcarifer*. Lei et al. (2010), buscaram identificar os efeitos anti-helmíntico de monoterpenos em *Caenorhabditis elegans* e determinaram que esses compostos agem sobre receptores de tiramina, inibindo a motilidade e o bombeamento da faringe do helminto. São escassos os estudos com a descrição da ação do mentol e do acetato de mentila como anti-helmíntico de Monogenea. O que se encontra são estudos demonstrando que o Mentol funciona como anestésico para algumas espécies de peixes (Spanghero et al., 2019), pois atua no sistema GABA<sub>A</sub>, neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (Zhang et al., 2008). A estimulação do GABA<sub>A</sub> por drogas agonistas promove a hiperpolarização da membrana celular, causando depressão do sistema nervoso e consequente anestesia ao organismo (Guénette et al., 2007). No presente estudo, é possível que o mentol esteja atuando como anestésico, inibindo seus movimentos e causando morte por anestesia profunda.

O óleo de *L. alba* não apresentou eficácia na atividade anti-helmíntica contra o Monogenea, em nenhuma das concentrações testadas. Entretanto, Soares et al. (2016) registrou 100% de eficácia *in vitro* em todas as concentrações desse OE contra as espécies de Monogenea das brânquias de tambaqui *Colossoma macropomum* e os melhores resultados foram observados nas concentrações de 1.289 e 2.560 mg L<sup>-1</sup>.

Apesar das plantas medicinais ou seus constituintes bioquímicos majoritários isolados terem a vantagem da baixa toxicidade quando comparados aos produtos quimioterápicos (Huang et al., 2013; Zhang et al., 2013; Zheng et al., 2009), elevadas concentrações obtidas nos ensaios *in vitro* nem sempre podem ser utilizadas no controle e tratamento contra parasitos em peixes, devido à toxicidade do produto (Hashimoto et al., 2016; Ji et al., 2012).

A ação de fitoterápicos como antiparasitário pode reduzir a utilização de quimioterápicos, proporcionando maior sustentabilidade à produção de peixes e reduzir os riscos ambientais no tratamento dos parasitas (Huang et al., 2013). Diante disso, o presente estudo mostrou diferenças na dose-resposta dos OE para *Neobenedenia* encontrado na tainha (*Mugil liza*). No entanto, essas concentrações precisam ser testadas *in vivo*, para que o produto seja utilizado de forma segura e eficiente contra *Monogenea* na piscicultura, em especial, a Marinha.

#### 2.1.4.2 Teste *in vitro* com formol, peróxido de hidrogênio, permanganato de potássio e cloreto de sódio

Em relação a testes com quimioterápicos Sitjà-Bobadilla et al (2006) utilizou peróxido de hidrogênio como antiparasitário para o *Monogenea Sparicotyle chrysophrii* de *Sparus aurata* L. e observou que a concentração de 200 ppm foi eficaz contra os parasitos adultos em 30 min de exposição. Hirazawa et al. (2016) relatou que concentrações de 75 ppm de peróxido de hidrogênio por 30 min ou 60 min foi suficiente para obter a mortalidade de *Benedenia seriolae*, *Neobenedenia girellae* e *Zeuxapta japônica*, parasitos de *Seriola dumerili*, em teste *in vitro*. Os efeitos desse composto estão relacionados ao estresse oxidativo que ao entrar em contato com o organismo pode causar ruptura da membrana celular e consequente morte do parasito. De acordo com Betteridge (2000), o peróxido de hidrogênio é capaz de difundir-se rapidamente através das membranas celulares e, na presença de íons de metais de transição, podem ser convertidos em radicais hidroxila através da reação de Fenton. O radical hidroxila causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial e no DNA ele ataca tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose (Barreiros & David, 2006).

Em relação ao permanganato de potássio Campos et al. (2014) observaram que independente da concentração utilizada, esse composto eliminou do protozoário ciliado *Epistylis* sp. parasito de cachara *Pseudoplatystoma reticulatum*, e a prevalência foi significativamente menor no tratamento de 2,5 mg L<sup>-1</sup>. Umeda et al. (2006) relatou que as concentrações de 2, 5, 10 e 20 mg L<sup>-1</sup> de permanganato afetou mais de 75% de oncomiracídio *Pseudodactylogyrus anguillae* e *P. bini*, com redução gradativa dos movimentos e morte após 5 h de exposição do produto. No entanto, dependendo da concentração, o permanganato de potássio pode ser tóxico e causar diversos efeitos negativos ao organismo, como lesões e necrose nos tecidos e brânquias em algumas espécies de peixes (Intorre et al., 2007). No presente estudo, a provável causa da morte do *Monogenea* pode ter sido o efeito tóxico e corrosivo do produto, uma vez que, o parasito o absorveu rapidamente, com a mudança de

coloração para roxo azulado, à medida que a concentração aumentou, além de apresentar fragmentação ao ser estimulado com agulha.

De forma semelhante Tancredo et al. (2019) testou seis concentrações *in vitro* de formalina 37% contra *Dactylogyrus minutus* Monogenea de *Cyprinus carpio* e a concentração de 200 mg L<sup>-1</sup> foi a mais eficaz, matando todos os parasitas em 16 minutos. Andrade-Porto et al. (2017) registrou a sensibilidade à formalina *in vitro* para o Monogenea *Dawestrema cicloancistrum* parasito de *Arapaima gigas* e os resultados apresentaram 100% de sensibilidade quando exposto a concentrações acima de 660 mg L<sup>-1</sup>. O formol devido a sua solubilidade em água, é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal e rapidamente metabolizado pelos animais (INCA, 2019), por esse motivo a intoxicação pode ter sido a causa mais provável da morte dos parasitos. Além disso, em soluções aquosas, o formaldeído forma o hidrato de etileno, um metileno glicol (Singer, 1962), que em contato com o parasito pode estar ocasionando rápida desidratação das células levando o parasita a morte.

A água doce é recomendada para tratamento terapêutico de espécies de peixes marinhos cultivados, geralmente quando estes estão infestados por parasitos do grupo Monogenea (Sanches & Vianna, 2007). Esse tratamento tem vantagens principalmente para espécies que suportam grandes variações de salinidade, e de acordo Vieira & Scalabrin (1991) a tainha, *M. liza* tem boa resistência às variações de temperatura e principalmente salinidade, possibilitando a utilização de banhos de água doce nessa espécie cultivadas em água marinha. Sanches (2008) registrou que banho em água doce por 10 minutos é eficiente para desprender os parasitos *Neobenedenia melleni* da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. Enquanto Jithendran et al. (2005) tiveram sucesso na eliminação de *Neobenedenia melleni* em garoupa *Epinephelus tauvina* empregando banhos em água doce com duração de 15 min. O trabalho osmótico necessário para manter a concentração osmótica corresponde à reposição de íons para compensar a perda difusiva e a eliminação do excesso de água adquirido por osmose (Marshall & Grosell, 2006). A mortalidade do parasito *Neobenedenia* sp. em água doce pode estar associada a dificuldade do equilíbrio osmótico desse indivíduo, uma vez que, a mudança drástica no ambiente pode ter dificultado a realização de suas trocas em tempo hábil.

### 2.1.5. Conclusão

Com exceção do óleo essencial de *Lippia alba*, todos os demais óleos, quimioterápicos e o tratamento com água doce causaram a mortalidade *in vitro* de *Neobenedenia* sp. Dentre os fitoterápicos, a *Lippia origanoides* se destacou com o melhor resultado, sendo mais eficiente contra o Monogenea na concentração 600 mg L<sup>-1</sup>. Entre os quimioterápicos o peróxido de



hidrogênio apresentou maior eficiência contra o parasito na concentração 350 mg L<sup>-1</sup>. Além disso, a água doce também pode ser utilizada como um antiparasitário eficaz contra os Monogenea da tainha *Mugil liza*.

### 2.1.6 Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado à C.S. Silva, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de Produtividade em Pesquisa à M.L. Martins (CNPq 306635/2018-6) e V.R. Cerqueira (CNPq309101/2017-4), Projeto "Criação da tainha *Mugil liza*: controle da reprodução, qualidade de água e alimentação de larvas e juvenis", à Dra. Edsandra Campos Chagas (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Amazônia Ocidental) pela extração e composição dos óleos essenciais. Este estudo foi parcialmente financiado pela Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## REFERÊNCIAS

- Adams, R.P. (2007) Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry. 4 (ed). Carol Stream: Allured Publishing Corporation
- Andrade-Porto, S. M, Affonso, E. G., Kochhann, D., Oliveira, M. J. C, Roque, R., Ono, E. A., Araújo, C. S. O., & Tavares-Dias, M. (2017). Antiparasitic efficacy and blood effects of formalin on *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae). *Aquaculture*, 479, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.009>
- Andre, W. P. P., Ribeiro, W. L. C., Cavalcante, G. S., Santos, J. M. L. do., Macedo, I. T. F., Paula, H. C. B. d., de Freitas, R. M., de Moraes, S. M., Melo, J. V. d., & Bevilacqua, C. M. L. (2016). Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. *Veterinary Parasitology*, 218, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.01.001>
- Araújo, C. S. de O., Tavares-dias, M., Gomes, A. L. S., Andrade, S. M. S., Gonzaga, J. R. L., Oliveira, A. T. De, Cruz, W. R., & Affonso, E. G. (2009). Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz , ( Arapaimidae ) cultivados no estado do Amazonas , Brasil. In M. Tavares-Dias (Ed.), *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo* (1st ed., pp. 389–429).
- Barreiros, A. L. B. S., & David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*, 29(1), 113–123.
- Benavides-González, F., Gomez-Flores, R. A., Rábago-Castro, J. L., Sánchez-Martínez, J. G., & Montelongo-Alfaro, I. O. (2015). Effects of hydrogen peroxide and metrifonate on monogenean *ligictalurus floridanus* on Catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque) Gills. *Journal of Parasitology*, 101(6), 707–710. <https://doi.org/10.1645/15-791>

Betteridge, D. J. (2000). What Is Oxidative Stress? *Metabolism*, 49(2), 3–8.

Bondad-Reantaso, M. G., Subasinghe, R. P., Arthur, J. R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., & Shariff, M. (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*, 132(3-4 SPEC. ISS.), 249–272.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.005>

Bowker, J. D., Carty, D., & Dotson, M. M. (2012). Efficacy of 35% PEROX-AID (hydrogen peroxide) in reducing an infestation of gyrodactylus salmonis in freshwater-reared rainbow trout. *North American Journal of Aquaculture*, 74(2), 154–159.  
<https://doi.org/10.1080/15222055.2012.675992>

Bravo-hollis, M. (1971). Helmintos de peces del Pacífico mexicano. XXIX. Descripción de dos monogéneos nuevos de la familia Capsalidae Baird, 1853, subfamilia Benedeniinae Johnston, 1931, de Baja California. *Revista de Biología Tropical*, 18(1–2), 155–171.  
<https://doi.org/10.15517/rbt.v18i1-2.28095>

Bullard, S. A., Benz, G. W., Overstreet, R. M., Williams, E. H., & Hemdal, J. (2000). Six new host records and an updated list of wild hosts for *Neobenedenia melleni* (MacCallum) (Monogenea: Capsalidae). *Comparative Parasitology*, 67(2), 190–196.

Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7), 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>

Calixto da Silva, E., Sterzelecki, F. C., Alves Musialak, L., Sugai, J. K., Castro, J. de J. P., Pedrotti, F. S., Magnotti, C., Cipriano, F. dos S., & Cerqueira, V. R. (2020). Effect of feeding frequency on growth performance, blood metabolites, proximate composition and digestive enzymes of Lebranche mullet (*Mugil liza*) Juveniles. *Aquaculture Research*, 51(3), 1162–1169. <https://doi.org/10.1111/are.14466>

Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2580–2595. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>

Campos, C. M. De, Rodrigues, R. A., De, C. A. L., Nunes, A. L., Fantini, L. E., & Ushizima, T. T. (2014). Permanganato de potássio como agente terapêutico no controle de *Epistylis* sp. em cachara *Pseudoplatystoma reticulatum* e seus efeitos na hematologia\*. *Boletim Instituto de Pesca*, 40(2), 157–166.

Carvalho, C. V. A. de, Passini, G., Sterzelecki, F. C., Baloi, M. F., & Cerqueira, V. R. (2019). Maturation, spawning and larviculture of the mullet *Mugil liza* under laboratory conditions. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 43(1), 31–36.

Cerqueira, V. R., Carvalho, C. V. A. De, Sanches, E. G., Passini, G., Baloi, M., & Rodrigues, R. V. (2017). Manejo de reprodutores e controle da reprodução de peixes marinhos da costa brasileira. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 41(1), 94–102.

Chagas, A C S. 2004. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13, 156-160.

Costa, C. M. de S., da Cruz, M. G., Lima, T. B. C., Ferreira, L. C., Ventura, A. S., Brandão, F.

- R., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Martins, M. L., & Jerônimo, G. T. (2020). Efficacy of the essential oils of *Mentha piperita*, *Lippia alba* and *Zingiber officinale* to control the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* in *Colossoma macropomum*. *Aquaculture Reports*, 18(6), 100414. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100414>
- Crosetti, D., Blaber, S. J. M. 2015. Biology, ecology and culture of grey mullets (Mugilidae). (Ed.). CRC Press.
- Cruz, C. da, Fujimoto, R. Y., Luz, R. K., Portella, M. C., & Martins, M. L. (2005). Toxicidade aguda e histopatologia do fígado de larvas de trairão (*Hoplias lacerdae*) expostas à solução aquosa de formaldeído a 10%. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 15, 21–28. <https://doi.org/10.5380/pes.v15i0.4502>
- Cruz, C., Machado-neto, J. G., & De Menezes, M. L. (2004). Toxicidade aguda do inseticida paration metílico e do biopesticida azadiractina de folhas de neem (*Azadirachta indica*) para alevino e juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 14(January 2016). <https://doi.org/10.5380/pes.v14i0.3127>
- Durand, J. D., Shen, K. N., Chen, W. J., Jamandre, B. W., Blel, H., Diop, K., Nirchio, M., Garcia de León, F. J., Whitfield, A. K., Chang, C. W., & Borsa, P. (2012). Systematics of the grey mullets (Teleostei: Mugiliformes: Mugilidae): Molecular phylogenetic evidence challenges two centuries of morphology-based taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64(1), 73–92. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.03.006>
- Escobar, P., Leal, S. M., Herrera, L. V., Martinez, J. R., & Stashenko, E. (2010). Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *105*(3), 184–190.
- Fischer, L G., Pereira, L E D., Vieia, J P. 2011. Peixes estuarinos e costeiros, (2ed). Rio Grande.
- Forwood, J. M., Harris, J. O., & Deveney, M. R. (2013). Efficacy of current and alternative bath treatments for *Lepidotrema bidyana* infecting silver perch, *Bidyanus bidyanus*. *Aquaculture*, 416–417, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.034>
- Forwood, J. M., Harris, J. O., Landos, M., & Deveney, M. R. (2014). Minimum effective concentrations of formalin and sodium percarbonate on the free-living stages of an Australian isolate of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology Research*, 113(9), 3251–3258. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3987-5>
- Giarratana, F., Muscolino, D., Beninati, C., Giuffrida, A., & Panebianco, A. (2014). Experimental Parasitology Activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Anisakis* larvae. *Experimental Parasitology*, April, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.028>
- Githiori, J. B., Athanasiadou, S., & Thamsborg, S. M. (2006). Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology*, 139(4), 308–320. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.021>
- Gomes, S. V. F., Nogueira, P. C. L., & Moraes, V. R. S. (2011). Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. *Eclética Química*, 36(1), 64–77.

- Guénette, S. A., Uhland, F. C., Hélie, P., Beaudry, F., & Vachon, P. (2007). Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, *266*, 262–265. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.046>
- Hashimoto, G. S. de O., Neto, F. M., Ruiz, M. L., Acchile, M., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., & Martins, M. L. (2016). Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture*, *450*, 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.029>
- Hirazawa, N., Ohtaka, T., & Hata, K. (2000). Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Aquaculture*, *188*(1–2), 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00334-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00334-3)
- Hirazawa, N., Takano, R., Hagiwara, H., Noguchi, M., & Narita, M. (2010). The influence of different water temperatures on *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection, parasite growth, egg production and emerging second generation on amberjack *Seriola dumerili* (Carangidae) and the histopathological effect of this parasite on fi. *Aquaculture*, *299*(1–4), 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.025>
- Hirazawa, N., Tsubone, S., & Takano, R. (2016). Anthelmintic effects of 75ppm hydrogen peroxide treatment on the monogeneans *Benedenia seriolae*, *Neobenedenia girellae*, and *Zeuxapta japonica* infecting the skin and gills of greater amberjack *Seriola dumerili*. *Aquaculture*, *450*, 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.028>
- Hoai, T. D., & Hutson, K. S. (2007). Reproductive strategies of the insidious fish ectoparasite, *Neobenedenia* sp. (Capsalidae: Monogenea). *PLoS ONE*, *40*(2), 96–100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108801>
- Huang, A. G., Yi, Y. L., Ling, F., Lu, L., Zhang, Q. Z., & Wang, G. X. (2013). Screening of plant extracts for anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitology Research*, *112*(12), 4065–4072. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3597-7>
- INCA, instituto nacional do câncer. (2019). Formol ou Formaldeído. [www1.inca.gov.br/impressao.asp?op=cv&id=795](http://www1.inca.gov.br/impressao.asp?op=cv&id=795). Acesso em 11 de junho de 2020.
- Intorre, L., Meucci, V., Bello, D. Di, Monni, G., Soldani, G., & Pretti, C. (2007). Tolerance of benzalkonium chloride, formalin, malachite green, and potassium permanganate in goldfish and zebrafish. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *231*(4), 590–595. <https://doi.org/DOI:10.2460/javma.231.4.590>
- Ji, J., Lu, C., Kang, Y., Wang, G., & Chen, P. (2012). Screening of 42 medicinal plants for in vivo anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitology Research*, *111*(1), 97–104. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2805-6>
- Kohn, A., Justo, Ma. C. N., & Cohen, S. C. (2016). Monogenoidea. In J. C. Eiras, A. L. Velloso, & J. Pereira Jr (Eds.), *Parasitas de peixes marinhos da América do Sul* (2nd ed., pp. 52–94).
- Lemos, V. M., Varela, A. S., Schwingel, P. R., Muelbert, J. H., & Vieira, J. P. (2014).

Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in south Brazil. *Journal of Fish Biology*, 85(3), 671–687. <https://doi.org/10.1111/jfb.12452>

Magnotti, C., & Cipriano, F. (2020). *Avanços na reprodução da tainha Mugil liza: maturação e desova de reprodutores selvagens e fl em cativeiro*. June.

Majolo, C., da Rocha, S. I. B., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., & Bizzo, H. R. (2017). Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 48(5), 2380–2387. <https://doi.org/10.1111/are.13073>

Malheiros, D. F., Maciel, P. O., Videira, M. N., & Tavares-Dias, M. (2016). Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). *Aquaculture*, 455(1), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.018>

Marsha, LL & W., Grosell, M. 2006. Ion transport, osmoregulation and acid-base balance. In: *The Physiology of Fishes*. D. Evans and J. Caiborne (ed.), Boca Raton, pp. 177-230. FL: CRC Press.

Matos, F.J.A. (1996). As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil - Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E Brown (Verbenaceae). Parte II - Farmacoquímica. *Revista Brasileira Farmácia*, 77, 137-141.

Medeiros, M. das G. F., Silva, A. C., Maria, A., Citó, A. M. G. L., Borges, A. R., Lima, S. G., Arimatéia, J., Lopes, J. A. D., & Figueiredo, R. C. B. Q. (2011). Parasitology International *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitology International*, 60(3), 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.03.004>

Menezes, N. A. (2010). An old taxonomic dilemma: the identity of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). *Zootaxa*, 68(6), 59–68.

Militz, T. A., Southgate, P. C., Carton, A. G., & Hutson, K. S. (2013). Efficacy of garlic (*Allium sativum*) extract applied as a therapeutic immersion treatment for *Neobenedenia* sp. management in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 37(5), 451–461. <https://doi.org/10.1111/jfd.12129>

Miranda filho, K. campos, Tesser, M. B., Sampaio, L. A., & Godinho, H. M. (2010). Tainha. In B. Baldisserotto & L. de C. Gomes (Eds.), *Espécies nativas para piscicultura no Brasil* (pp. 541–552).

Morais, S. M. de, Vila-nova, N. S., Bevilaqua, C. M. L., Rondon, F. C., Lobo, C. H., Moura, A. D. A. A. N., Sales, A. D., Rodrigues, A. P. R., Figueiredo, J. D. R., Campello, C. C., Wilson, M. E., & Andrade Jr, H. F. de. (2014). Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.08.020>

Ogawa, K. (2015). Diseases of cultured marine fishes caused by Platyhelminthes (Monogenea, Digenea, Cestoda). *Parasitology*, 142(1), 178–195. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000808>

Ogawa, Kazuo, Miyamoto, J., Wang, H. C., Lo, C. F., & Kou, G. H. (2006). *Neobenedenia*

girellae (Monogenea) infection of cultured cobia *Rachycentron canadum* in Taiwan. *Fish Pathology*, 41(2), 51–56. <https://doi.org/10.3147/jsfp.41.51>

Pádua, S. B. de, Pietrop, S. de, Iglecias-Filho, P. S., Ishikawa, M. M., & Hisano, H. (2010). Mentol como anestésico para dourado (*Salminus brasiliensis*). *Boletim Do Instituto De Pesca*, 36(2), 143–148.

Pahor-Filho, E., Miranda-Filho, K. C., & Pereira Júnior, J. (2012). Parasitology of juvenile mullet (*Mugil liza*) and effect of formaldehyde on parasites and host. *Aquaculture*, 354–355, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.032>

Park, K. H., Zeon, S. R., Lee, J. G., Choi, S. H., Shin, Y. K., & Park, K. I. (2014). *In vitro* and *in vivo* efficacy of drugs against the protozoan parasite *Azumiobodo hoyamushi* that causes soft tunic syndrome in the edible ascidian *Halocynthia roretzi* (Drasche). *Journal of Fish Diseases*, 37(4), 309–317. <https://doi.org/10.1111/jfd.12104>

Queiroz, M. R. A., Almeida, A. C., Andrade, V. A., Lima, T. S., Martins, E. R., Figueiredo, L. S., & Careli, R. T. (2014). Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16(3), 737–743. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/13\\_083](https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_083)

Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>

Sanches, E. G. (2008). Controle de *Neobenedenia melleni* (MacCallum, 1927) (Monogenea: Capsalidae) em garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), cultivada em tanques-rede. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 17(3), 145–149. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612008000300005>

Sanches, E. G., & Vianna, R. T. (2007). Ocorrência de *Neobenedenia melleni* (monogenea: capsalidae) em garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus* (lowe, 1834), cultivada em tanques-rede. *Arquivos de Ciências Do Mar*, 40(2), 96–100. <https://doi.org/10.32360/acmar.v40i2.6118>

Sarrazin, S. L. F., Silva, L. A., Oliveira, R. B., Raposo, J. D. A., Kelly, J., Silva, R., Salimena, F. R. G., Maia, J. G. S., & Mourão, R. H. V. (2015). Antibacterial action against food-borne microorganisms and antioxidant activity of carvacrol-rich oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Lipids in Health and Disease*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0146-7>

Silveira, J.C., Busato, N.V., Costa, A.O.S., Junior, E.F.C. (2012). Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. *Enciclopédia Biosfera*, 8(15), 2038–2052.

Singer, S.J. 1962: The properties of proteins in nonaqueous solvents. *Advances in Protein Chemistry*; 17,1–68. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60051-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60051-0)

Siquier, G. F., & De Núñez, M. O. (2009). *Ligophorus uruguayense* sp. nov. (Monogenea, Ancyrocephalidae), a gill parasite from *Mugil platanus* (Mugiliformes, Mugilidae) in Uruguay. *Acta Parasitologica*, 54(2), 95–102. <https://doi.org/10.2478/s11686-009-0016-4>

Sitjà-Bobadilla, A., de Felipe, M. C., & Alvarez-Pellitero, P. (2006). *In vivo* and *in vitro*

treatments against *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 261(3), 856–864.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.012>

Soares, B. V., Cardoso, A. C. F., Campos, R. R., Gonçalves, B. B., Santos, G. G., Chaves, F. C. M., Chagas, E. C., & Tavares-Dias, M. (2017). Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. *Aquaculture*, 469, 72–78.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.001>

Soares, B. V., Neves, L. R., Oliveira, M. S. B., Chaves, F. C. M., Dias, M. K. R., Chagas, E. C., & Tavares-Dias, M. (2016). Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. *Aquaculture*, 452, 107–114.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.029>

Sousa, J. P. De, Oliveira, K. A. R., De Figueiredo, R. C. B. Q., & De Souza, E. L. (2015). Influence of carvacrol and 1,8-cineole on cell viability, membrane integrity, and morphology of aeromonas hydrophila cultivated in a vegetable-based broth. *Journal of Food Protection*, 78(2), 424–429. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-242>

Spanghero, D. B. N., Spanghero, E. C. A. de M., Pedron, J. dos S., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., & Zaniboni-Filho, E. (2019). Peppermint essential oil as an anesthetic for and toxicity to juvenile silver catfish. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 54.  
<https://doi.org/10.1590/S1678-3921.PAB2019.V54.00367>

Tancredo, K. R., Marchiori, N. da C., Pereira, S. A., & Martins, M. L. (2019). Toxicity of formalin for fingerlings of *Cyprinus carpio* var. koi and in vitro efficacy against *Dactylogyrus minutus* Kulwièc, 1927 (Monogenea: Dactylogyridae). *Journal of Parasitic Diseases*, 43(1), 46–53. <https://doi.org/10.1007/s12639-018-1056-1>

Tarkhani, R., Hedayati, A., Bagheri, T., Shadi, A., & Khalili, M. (2012). Investigation of LC 50, NOEC and LOEC of Zebra fish (*Danio rerio*) in response to common agricultural pesticides in *Golestan province*, 57–62.

Tavares-Dias, M. (2018). Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. *Aquatic Living Resources*, 31(13), 4–7.  
<https://doi.org/10.1051/alr/2018001>

Tavares-dias, M., Morais, F. R., & Martins, M. L. (2008). Hematological assessment in four Brazilian teleost fish with parasitic infections, collected in feefishing from Franca, São Paulo, Brasil. *Boletim Instituto de Pesca*, 34(2), 189–196.

Teles, S., Alberto, J., Muniz, L., Oliveira, D., Malheiro, R., Santigo, S., Lucchese, A. M., & Silva, F. (2014). Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia*. *Industrial Crops & Products*, 59, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.010>

Trujillo-González, A., Constantinoiu, C. C., Rowe, R., & Hutson, K. S. (2015). Tracking transparent monogenean parasites on fish from infection to maturity. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3), 316–322.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.06.002>

Umeda, N., Nibe, H., Hara, T., & Hirazawa, N. (2006). Effects of various treatments on hatching of eggs and viability of oncomiracidia of the monogenean *Pseudodactylogyrus anguillae* and *Pseudodactylogyrus bini*. *Aquaculture*, 253(1–4), 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.08.009>

Vicuña, G. C., Stashenko, E. E., & Fuentes, J. L. (2010). Fitoterapia Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*, 81(5), 343–349. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.10.008>

Vieira, JP. & SCALABRIN, C. 1991. Migração reprodutiva da Tainha *Mugil platanus*, Günther, 1880 no sul do Brasil. *Atlântica* 131, 131-141

Whittington, I. D., & Horton, M. A. (1996). A revision of *Neobenedenia* Yamaguti, 1963 (Monogenea: Capsalidae) including a redescription of *N. melleni* (MacCallum, 1927) Yamaguti, 1963. *Journal of Natural History*, 30(8), 1113–1156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/00222939600770611>

Whittington, Ian D. (2004). The capsalidae (Monogenea: Monopisthocotylea): A review of diversity, classification and phylogeny with a note about species complexes. *Folia Parasitologica*, 51(2–3), 109–122. <https://doi.org/10.14411/fp.2004.016>

Yamaguti, S. (1963). *Systema helminthum*. IV. Monogenea and Aspidocotylea. John Wiley and Sons, Interscience Publishers, New York, 699 p. 1968. Monogenetic trematodes of Hawaiian fishes. University of Hawaii Press, Honolulu.

Zhang, Q., Xu, D., & Klesius, P. H. (2013). Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Veterinary Parasitology*, 198(1–2), 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.08.019>

Zhang, X., Jiang, P., Gong, N., Hu, X., Fei, D., Xiong, Z., Xu, L., & Xu, T. (2008). A-Type GABA Receptor as a central target of TRPM8 Agonist Menthol. 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003386>

Zheng, Z. L., Tan, J. Y. W., Liu, H. Y., Zhou, X. H., Xiang, X., & Wang, K. Y. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 292(3–4), 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.025>



## 2.2 ARTIGO 2

### **Suplementação dietética com óleo essencial de *Lippia origanoides* como antiparasitário para juvenis de tainha (*Mugil liza*)**

Cleize Sales da Silva<sup>1\*</sup>, Elenice Martins Brasil<sup>1</sup>, Caio Magnotti<sup>1</sup>, Vanessa Martins da Rocha<sup>1</sup>, Kauana Cipriano<sup>1</sup>, Marilia Lazarotto<sup>2</sup>, Liseth Carolina Perenguez Riofrío<sup>1</sup>, Liseth Vanessa Perenguez Riofrío, Francisco Célio Maia Chaves<sup>3</sup>, Mariana Rangel Pilotto<sup>1</sup>, Maurício Laterça Martins<sup>2</sup>, Vinicius Ronzani Cerqueira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LAPMAR - Laboratório de Piscicultura Marinha, Departamento de Aquicultura, Faculdade de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>2</sup>AQUOS - Laboratório de Saúde de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Faculdade de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>3</sup>Embrapa Amazônia Ocidental, Rod. AM 10, km 29 s / n, 69010-970, Manaus, Amazonas, Brasil.

**\*Autor correspondente:** Cleize Sales da Silva. LAPMAR - Laboratório de Piscicultura Marinha, Departamento de Aquicultura, Faculdade de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil

#### **Declaração de disponibilidade dos dados**

Os dados que apoiam as conclusões deste estudo estão disponíveis com o autor correspondente, mediante solicitação.

## Resumo

Os óleos essenciais têm ganhado destaque dentre os fitoterápicos aprovados e utilizados no controle de enfermidades em peixes *in vivo*. As pesquisas estão sendo realizadas também como aditivos alimentares, apresentando pontos positivos por conter grande variedade de nutrientes e compostos químicos terapêuticos. O objetivo deste estudo foi utilizar uma ração suplementada com óleo essencial de *Lippia organoides*, como antiparasitário de *Neobenedenia* sp. presentes nos juvenis de tainha *Mugil liza*. Foram realizados 4 tratamentos e um controle (em triplicata) com densidade de 10 peixes por tanque e alimentados com ração suplementada nas seguintes concentrações: 0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0%. Os peixes utilizados foram obtidos de reprodução artificial em laboratório. Os juvenis de tainha foram alimentados quatro vezes ao dia por 62 dias. Ao final do experimento foram realizadas a biometria de todos os peixes, coleta dos parasitos e coleta de sangue, para posterior análise. Os maiores valores de abundância e intensidade média de parasitismo foram registrados no tratamento controle, sem adição de óleo. As concentrações de 1,0 e 1,5% tiveram um único indivíduo que não apresentou parasitos em sua superfície corporal. As concentrações testadas do óleo de *L. organoides* suplementado na ração para juvenis de tainha *Mugil liza* não foram eficazes na eliminação do monogenoide *Neobenedenia* sp. Portanto, não recomendamos a utilização desse tratamento.

**Palavras-chave:** Óleo essencial, monogenea, parasitologia, mugilidae

## Summary

Essential oils have gained prominence among the herbal medicines approved and used to control fish diseases in *in vivo* tests. Research is also being carried out using them as food additives, showing positive points because they contain a wide variety of nutrients and chemical compounds. The aim of this study was to use a diet supplemented with *Lippia organoides* essential oil as an antiparasitic against *Neobenedenia* sp. Four treatments and one control (in triplicate) were carried out with a density of 10 mullet juveniles per tank and fed a diet with the following concentrations: 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0%. The fish used in the experiment were obtained through artificial reproduction in laboratory. They were fed four times a day for 62 days. At the end of the experiment, all the fish were measured, parasites were collected, and blood was sampled for further analysis. The parasitological indices of *M. liza* fed diets with essential oil were similar to the non-supplemented animals. The highest values of abundance and average intensity were in the control. The 1.0 and 1.5% treatments had a single specimen that did not present parasites on its body surface. The tested concentrations of *L. organoides* supplemented in the diet of *Mugil liza* mullet juveniles were not effective in eliminating the monogenoid *Neobenedenia* sp.

**Keywords:** Essential oil, monogenea, parasitology, mugilidae

### 2.2.1 Introdução

Os óleos essenciais têm ganhado destaque dentre os fitoterápicos aprovados e utilizados no controle de parasitos. Eles são misturas complexas de numerosos compostos obtidos das plantas, possuem compostos voláteis, especialmente por compostos químicos terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanóides (CALSAMIGLIA et al., 2007), geralmente exercendo função de defesa nas plantas, frente às agressões externas (BRISKIN, 2000). Apesar de serem permitidos na prevenção e tratamento de enfermidades dos organismos aquáticos (BRASIL, 2011), seu uso necessita de estudos que comprovem sua eficácia na aquicultura, bem como o estabelecimento de protocolos terapêuticos para o tratamento das enfermidades (SOARES et al., 2016).

A utilização de fitoterápicos para o tratamento e controle de enfermidades em peixes já foi testada *in vitro* e *in vivo* em diversas espécies (TAVARES-DIAS, 2018). Para peixes já foram relatados benefícios e atividade biológica relacionada ao uso de plantas medicinais, resultando na promoção do crescimento, estimulação do apetite, estimulação imunológica, antimicrobiana e antiestresse (CHAKRABORTY et al., 2011; CITARASU, 2010). O uso desses produtos na dieta geralmente busca avaliar a resposta imune inata dos peixes, analisando os parâmetros não específicos (humorais e celulares) e hematoimunes e, portanto, a capacidade em conferir proteção imune inespecífica contra determinados patógenos (VALLEJOS-VIDAL et al., 2016).

Dentre os fitoterápicos que estão sendo testados em peixes, podemos destacar os que são produzidos a partir de plantas do gênero *Lippia*, que pertencem à família Verbenaceae, com aproximadamente 200 espécies, entre elas ervas, arbustos e pequenas árvores (PASCUAL et al., 2001). Esse grupo vem sendo explorado em diversas áreas na medicina veterinária, microbiologia, parasitologia, zootecnia e aquicultura, devido ao seu uso potencial e facilidade de produção agrônômica em larga escala (SOARES e TAVARES-DIAS, 2013). Em peixes, o óleo essencial de *Lippia alba* foi usado contra ectoparasitos monogenoide de *Colossoma macropomum* (SOARES et al., 2016) e *Lippia sidoides* contra monogenoide de *O. niloticus* (HASHIMOTO et al., 2016), com resultados antiparasitários promissores.

*Mugil liza* Valenciennes, 1836, conhecida popularmente no Brasil como tainha, pertence à classe Actinopterygii da ordem Perciformes e família Mugilidae. É encontrada desde o Caribe até a Argentina (MENEZES et al., 2015; DURAND et al., 2012; LEMOS, 2014). Apresentam características comportamentais, fisiológicas e morfológicas muito similares a outras espécies do gênero (DURAND et al., 2012; SICCHA et al., 2014; MENEZES et al., 2015). A espécie apresenta características importantes para a piscicultura, como grande tolerância a diferentes

salinidades e temperaturas e boa aceitação de fontes alimentares inertes (NETO e SPACH, 1998; SAMPAIO et al., 2002; CERQUEIRA et al., 2017). Estudos com utilização de fitoterápicos para mugilídeos são inexistentes, no entanto, já foram realizados alguns trabalhos com óleos essenciais na piscicultura marinha como potencial anestésico para peixes marinhos (BARATA et al., 2016; CÁRDENAS et al., 2016; MYLONAS et al., 2005). Este trabalho é o primeiro relato da utilização de um óleo essencial como antiparasitário para monogênea em um mugilídeo. Antes da realização dessa pesquisa, foi realizado um estudo (Capítulo I) com teste *in vitro* de várias concentrações de óleos essenciais de *Lippia alba*, *Lippia origanoides*, *Lippia sidoides* e *Mentha piperita*, assim como quimioterápicos, com intuito de verificar a melhor concentração e o óleo mais eficaz no tratamento contra *Neobenedenia* sp. A *L. origanoides* apresentou o melhor resultado e por isso foi utilizada para testes com banhos terapêuticos (dados não publicados). No entanto, mesmo a concentração mínima do óleo, que não foi eficaz contra o monogênea, mostrou-se tóxica aos juvenis de tainha, e por esse motivo a pesquisa avançou com a proposta de suplementar o óleo essencial na dieta dos peixes. Diante do exposto, o objetivo da pesquisa foi a suplementação do óleo essencial de *L. origanoides* na ração, em diferentes concentrações, para que este atue como um antiparasitário de *Neobenedenia* sp. presente nos juvenis de tainha *M. liza*.

## 2.2.2. Material e métodos

### 2.2.2.1 Composição química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram obtidos a partir das folhas das plantas cultivadas e processadas no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoquímica da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Manaus-AM, Brasil. Após coleta das folhas pela manhã, elas foram secas em estufa de circulação contínua a 45 °C por 48 h e a extração dos óleos essenciais foi realizada por processo de hidro destilação em aparelho tipo Clevenger (Matos, 1996; Silveira et al., 2012).

A composição química dos óleos *L. alba*, *L. origanoides* e *L. sidoides* e *M. piperita* foi determinada pelo método de cromatografia gasosa com equipamentos Agilent 6890 e detector de massas seletivo Agilent 5973N. A separação dos componentes foi realizada em uma coluna capilar HP5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com temperatura de 60 °C a 240 °C e variação de 3 °C m<sup>-1</sup>. O volume de 1,0 microlitro de uma solução contendo 1% de cada óleo foi injetado no divisor de fluxo na proporção de 1: 100 e mantido a 250 °C. A quantificação relativa (%)

dos componentes dos óleos foi realizada no cromatógrafo a gás Agilent 6890N, equipado com um detector de ionização de chama, mantido a 280 ° C, e por uma coluna capilar HP5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) com o uso de hidrogênio (1,5 mL min<sup>-1</sup>) como gás carreador. A identificação dos constituintes de cada óleo foi realizada comparando os espectros de massa obtidos pela biblioteca de espectros da 6ª edição de Wiley e comparando o índice de retenção calculado de cada componente com os dados da literatura. O cálculo do índice foi realizado pela injeção de uma série de n-alcenos nas mesmas condições analíticas utilizadas para os demais óleos (Adams, 2007).

#### 2.2.2.2 *Preparo das dietas experimentais*

O óleo essencial de *Lippia origanoides* foi utilizado para a elaboração das dietas experimentais e as concentrações pré-definidas foram adicionadas a uma ração comercial extrusada (Presence Nutripiscis AL45 2,3 mm 45% PB 8% ET),

O óleo essencial, nas concentrações 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0%, foi diluído em álcool de cereais na proporção de 200 g de álcool por quilo de ração comercial, e incorporado na ração por meio de aspersão com pulverizador manual. Em seguida, as dietas passaram por um processo de secagem de 24 horas em temperatura ambiente e, posteriormente, armazenadas em congelador até o dia da sua utilização (DAIRIKI et al., 2013),

#### 2.2.2.3 *Delineamento experimental*

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três repetições, um sem suplementação e os demais com as concentrações de óleo. As unidades experimentais foram 15 caixas d'água de 500 L com 10 juvenis de tainha *Mugil liza* em cada uma. O sistema no qual os peixes foram mantidos era de fluxo contínuo, aeração constante e elevada renovação de água (200% por dia). O período experimental foi de 62 dias, os quais os juvenis foram alimentados quatro vezes ao dia (8:30, 11:00, 14:00 e 16:00 h) até a saciedade aparente. Diariamente foram anotados os dados de consumo e de sobrevivência, assim como a retirada de sobras de ração dos tanques, uma hora após a última alimentação. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC/nº 1139170919).

#### 2.1.2.4 Monitoramento da qualidade da água

Os parâmetros de qualidade da água foram monitorados a cada 3 dias permanecendo em: oxigênio dissolvido  $7,43 \pm 0,77 \text{ mg L}^{-1}$ , temperatura  $19,16 \pm 1,75 \text{ }^\circ\text{C}$  (YSIPro 20), salinidade  $35,12 \pm 3,03 \text{ }^\circ\text{‰}$  (refratômetro) e pH  $8,28 \pm 0,25$  com pHmetro (EcoSense pH 10A).

#### 2.2.2.5 Análise do desempenho zootécnico

Antes das amostragens, os peixes passaram por um período de 24 horas de jejum. As biometrias foram realizadas no início e ao final do experimento, para análise dos seguintes parâmetros de desempenho zootécnico: Taxa de sobrevivência (TS) =  $100\% \times (\text{número final de peixes} / \text{número inicial de peixes})$ ; Ganho de peso diário (GPD) =  $[\text{Peso médio final (g)} - \text{Peso médio inicial (g)}] / \text{Peso médio inicial (g)} / \text{tempo (em dia)} * 100\%$ ; Taxa de eficiência proteica (TEP) =  $\text{Ganho de peso (g)} / \text{Proteína bruta ingerida (g)}$ ; Consumo individual de ração (CMRI) =  $\text{Quantidade de ração fornecida (kg)} / \text{Número de peixes}$ ; Conversão alimentar aparente (CAA) =  $\text{CMRI} / [(\text{Peso médio final (g)} - \text{Peso médio inicial (g)})]$ ; Taxa de crescimento específico (TCE) =  $100 \times (\ln \text{ peso médio final} - \ln \text{ peso médio inicial}) / \text{tempo}$ .

#### 2.2.2.6 Análise parasitológica

Ao final do experimento, foram coletados aleatoriamente 6 peixes por unidade experimental e a eutanásia foi realizada por secção medular (CONCEA, 2018). O muco foi raspado e armazenado em frascos plásticos com água destilada previamente aquecida ( $50\text{-}60 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e adicionada formalina em concentração final de 5%. O conteúdo coletado foi analisado individualmente em placa de Petri com o auxílio de lupa e quando encontrados, os parasitos foram armazenados em frascos de vidro de 10 mL e fixados em formalina na concentração de 5%,

Os parasitos foram montados em meio Hoyer's, entre lâmina e lamínula, para a observação de estruturas esclerotizadas específicas e identificados de acordo com Yamaguti (1963) como sendo *Neobenedenia* sp. Foram calculados os índices parasitários de acordo com Bush et al, (1997), tais como prevalência, intensidade média, abundância média e dominância média relativa.

#### 2.2.2.7 Coleta de sangue e análise dos parâmetros hematológicos e glicose

Ao final do experimento, foram coletadas amostras sanguíneas de todos os peixes, após anestesia com benzocaína, por punção dos vasos caudais com o auxílio de agulhas e seringas

de 3 mL, previamente umedecidas com EDTA (10%). Com auxílio de microscópio óptico (Leica, ICC50 HD, Alemanha), foi realizada a contagem total de eritrócitos em câmara de Neubauer, com diluição de Dacie (número de eritrócitos/ $\mu$ L de sangue). Também foi determinada a concentração de hemoglobina [Hb] e o hematócrito (%) de acordo com Ranzani-Paiva et al (2013) e Glicose (LabTest Ref.:43).

#### 2.2.2.8 *Análise estatística*

Os dados foram submetidos a análise descritiva e aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, a fim de verificar os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância, respectivamente. Os valores fora da curva foram substituídos pela média das repetições. Para as variáveis que atenderam estes pressupostos, aplicou-se o teste F, através da Análise de Variância (ANOVA) e quando verificada diferença entre os tratamentos, aplicou-se análise de regressão. Aos dados que não atenderam estes pressupostos aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com o nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no software R utilizando o pacote DescTools.

As análises foram realizadas no software R utilizando os pacotes ExpDes (variáveis paramétricas) e DescTools (variáveis não paramétricas) e os gráficos foram feitos utilizando o excel.

### 2.2.3. Resultados

#### 2.2.3.1 *Composição química dos óleos essenciais*

Os resultados da análise da composição química dos óleos essenciais de *L. origanoides*, *L. sidoides*, *L. alba* e *M. piperita* são mostrados no Apêndice 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Para os componentes químicos de *L. origanoides*, 100% foram quantificados e 92,90% foram identificados. Os componentes mais abundantes desse OE foram identificados como carvacrol (49,7%), timol (9,9%),  $\gamma$ -terpineno (11,6%) e linalol (2,8%). Em *L. sidoides*, 100% foram quantificados e 99,28% identificados. Os componentes com as maiores porcentagens foram timol (75,4 %), p-cimeno (7,3 %), (E) -caricofileno (4,3%) e  $\gamma$ -terpineno (3 %). Em *L. alba*, 100% dos componentes foram quantificados e 96,7% dos foram identificados. Os principais constituintes foram carvona (61,7%), limoneno (17,5%), mirceno (3,5%) e germacreno D (2,7%). Para *M. piperita*, 100% dos componentes foram quantificados e 99,8% foram

identificados. Os principais componentes foram mentol (30,5%), acetato de mentila (14,5%), pulegona (14,2%) e mentona (12,9%).

### 2.2.3.2 Desempenho zootécnico

Os dados zootécnicos dos juvenis de tainha *M. liza* após 62 dias de suplementação do óleo *L. organoides* na ração estão apresentados na Tabela 1. Os dados de ganho de peso diário (GPD), consumo individual de ração (CMRI) e conversão alimentar aparente (CAA) tiveram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Tabela 1. Desempenho zootécnico de juvenis de *Mugil liza* suplementados com óleo essencial de *Lippia organoides* nas concentrações 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% no período de 62 dias.

	Concentrações				
	0	0,5%	1%	1,5%	2%
<b>Peso Inicial (g)</b>	43,61 ± 1,22	46,04 ± 4,05	47,27 ± 1,78	43,000 ± 0,95	45,62 ± 2,88
<b>Peso Final (g)</b>	51,87 ± 2,27	50,49 ± 4,38	49,47 ± 3,75	46,13 ± 2,08	48,39 ± 6,11
<b><sup>1</sup>CP Inicial (cm)</b>	12,82 ± 0,11	13,10 ± 0,50	13,39 ± 0,33	12,962 ± 0,27	13,15 ± 0,47
<b>CP Final (cm)</b>	13,39 ± 0,22	13,25 ± 0,41	13,51 ± 0,28	13,413 ± 0,29	13,36 ± 0,82
<b><sup>2</sup>GPD*</b>	0,30 ± 0,04	0,33 ± 0,13	0,09 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,04
<b><sup>3</sup>CMRI*</b>	48,65 ± 6,56	30,39 ± 2,84	26,21 ± 4,17	19,68 ± 3,32	20,90 ± 3,11
<b><sup>4</sup>CAA*</b>	5,42 ± 5,60	4,40 ± 3,93	9,14 ± 9,55	18,68 ± 5,09	24,46 ± 1,34
<b><sup>5</sup>TCE*</b>	0,28 ± 0,03	0,28 ± 0,11	0,09 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,04

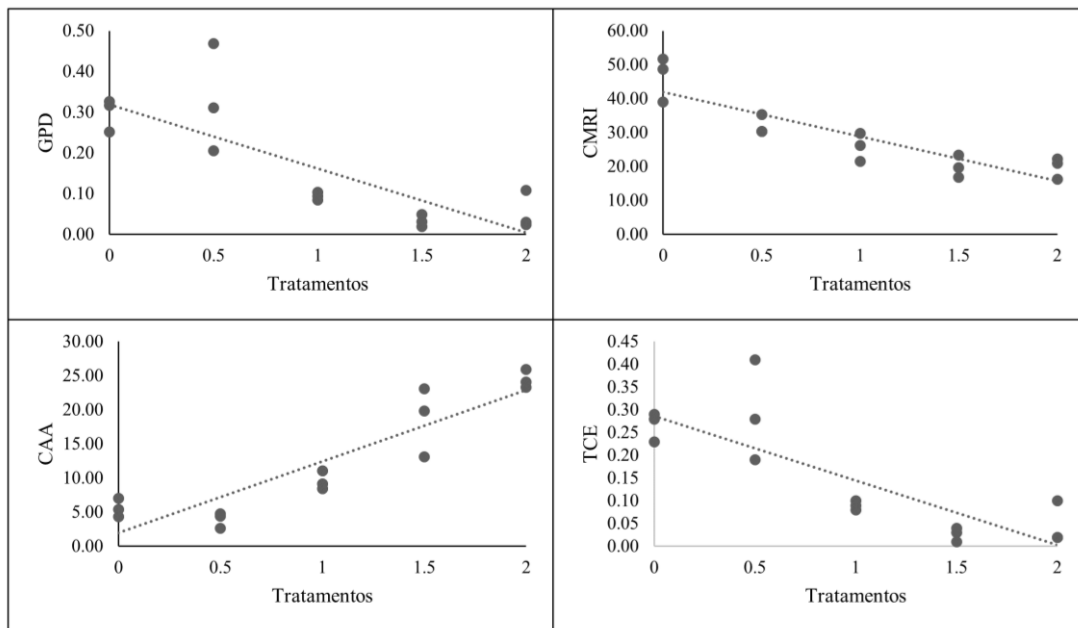
<sup>1</sup>CP comprimento padrão; <sup>2</sup>GPD ganho de peso diário; <sup>3</sup>CMRI consumo individual de ração; <sup>4</sup>CCA conversão alimentar aparente; <sup>5</sup>TCE taxa de crescimento específico.  
Valores de *p*: Peso inicial 0,95; Peso final 0,50; CP inicial 0,44; CP final 0,97; GPD 0,0004\*; CMRI 0,00008\*; CCA 0,03\*; TCE 0,0003\*

Fonte: Elaborado pelo autor

Os gráficos de regressão linear apresentados na Figura 5 mostram a diferença nas variáveis de desempenho zootécnico entre os tratamentos. O GPD diminuiu à medida que aumentou a concentração do óleo na ração, da mesma forma ocorreu com o CMRI. Entretanto, a CAA foi significativamente menor na menor concentração de óleo essencial de *L. organoides* na ração (0.5%), apresentando melhor resultado entre os tratamentos.



Figura 5. Regressão linear das variáveis de desempenho zootécnico de juvenis de *Mugil liza* suplementados com óleo essencial de *Lippia origanoides* nas concentrações 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% no período de 62 dias. Nível de significância  $p < 0,05$ .



Fonte: Elaborado pelo autor

### 2.2.3.3 Variáveis parasitológicas

Não foram observadas diferenças estatísticas entre índices parasitológicos de *M. liza* suplementados com 0,5, 1,0, 1,5, e 2% do óleo essencial de *L. origanoides* (Tabela 2). Os maiores valores de abundância e intensidade média foram registrados no tratamento controle. Além disso, com exceção dos tratamentos com as concentrações 1,0 e 1,5%, os demais tiveram 100% de prevalência do parasito *Neobenedenia* sp. De todas as amostras analisadas, as concentrações 1,0 e 1,5% tiveram um único indivíduo, cada, que não apresentou parasitos em sua superfície corporal.

Tabela 2. Índices parasitológicos de *Neobenedenia* sp, em juvenis de *M. Liza* com ração suplementada com óleo essencial de *L. origanoides*,

	Concentrações				
	0	0,5%	1%	1,5%	2%
<b>Nº Parasitos</b>	67,1 ± 66,1	79,1 ± 34,0	44,90 ± 13,91	36,20 14,58	23,91 ± 10,76
<b>Abundância</b>	85,1 ± 50,84	81,99 ± 28,96	65,12 ± 7,05	36,71 ± 14,26	49,10 ± 41,73
<b>Prevalência</b>	100 ± 0,00	100 ± 0,00	96,30 ± 6,41	96,67 ± 5,77	100 ± 0,00
<b>Intensidade média</b>	85,51 ± 50,84	81,99 ± 28,96	67,72 ± 7,08	37,66 ± 13,20	49,10 ± 41,73

Valores de  $p$ : Parasitos 0,20; Abundância 0,24; Prevalência 0,51; Intensidade média 0,24.

Fonte: Elaborado pelo autor

#### 2.2.3.4 Variáveis hematológicas e glicose

Não foram observadas diferenças estatísticas entre variáveis analisadas (Tabela 3). As médias de valores entre os tratamentos para o eritrócito e hematócrito e hemoglobina foram semelhantes. No entanto, a glicose apresentou uma redução na média de valores com o aumento de concentração do óleo na ração, obtendo o menor valor no tratamento com 2% de adição de óleo essencial, enquanto o maior valor foi observado no tratamento controle.

Tabela 3. Médias e Desvio Padrão dos parâmetros hematológicos e glicose de juvenis de tainha *M. liza* alimentados com ração suplementada com óleo essencial de *L. origanoides*, durante 62 dias de experimento.

	Concentrações				
	0	0,5%	1%	1,5%	2%
<b>Glicose (mg/dL)</b>	105,20 ± 41,10	101,10 ± 53,20	54,47 ± 15,42	63,10 ± 31,4	53,47 ± 10,10
<b>Eritrócitos (µL)</b>	1,3x10 <sup>6</sup> ± 3,1x10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>6</sup> ± 5,2x10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>6</sup> ± 2,6x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>6</sup> ± 1,6x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>6</sup> ± 2,1x10 <sup>5</sup>
<b>Hematócrito (%)</b>	26,18 ± 4,88	24,62 ± 0,78	23,91 ± 0,32	23,40 ± 0,32	23,98 ± 0,97
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	7,75 ± 0,02	7,77 ± 0,43	7,75 ± 0,23	7,21 ± 0,28	7,283 ± 0,79

Valores de *p*: Glicose 0,33; Eritrócito 0,93; Hematócrito 0,45; Hemoglobina 0,37.

Fonte: Elaborado pelo autor

## 2.2.4. Discussão

### 2.2.4.1 Desempenho zootécnico

Um estudo realizado por Costa et al. (2022) com óleo essencial de *Lippia grata* (= *L. gracilis*) como aditivo alimentar de juvenis de tabatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) observou-se que os animais do tratamento 0,5 mL kg<sup>-1</sup> ganharam mais peso e apresentaram maior taxa de crescimento específico do que aqueles tratados com 1,0 e 2,0 mL kg<sup>-1</sup>, embora nenhuma concentração tenha diferido significativamente. Além disso, a taxa de conversão alimentar foi melhor no tratamento 0,5 mL kg<sup>-1</sup> do que no tratamento 1,0 mL kg<sup>-1</sup>. Ribeiro et al. (2015) avaliaram o uso do óleo essencial de *Mentha piperita* na dieta do tambaqui por 30 dias e observaram que os parâmetros de desempenho produtivo de tambaquis não foram influenciados pelos níveis de inclusão do óleo na ração, não promovendo ganho de peso e nem crescimento satisfatório. Em nosso estudo a menor concentração do óleo essencial suplementado na ração (0,5%) apresentou significativamente menor conversão alimentar aparente, além de apresentar o maior ganho de peso diário entre os tratamentos. Embora não

diferindo estatisticamente na variável comprimento e ganho de peso final, o tratamento com 0,5% apresentou o melhor resultado.

#### 2.2.4.2 Variáveis parasitológicas

Uma pesquisa realizada por Brasil et al. (2019) mostrou que índices parasitológicos como prevalência, abundância média, dominância média e intensidade média dos grupos identificados não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com suplementação do óleo de *L. sidoides* suplementado na ração para carpa Koi (*Cyprinus carpio*) para o tratamento de endoparasitos. Entretanto, Oliveira et al. (2020) utilizaram óleos essenciais das espécies de *L. grata* (0,86 g kg<sup>-1</sup>) e *L. origanoides* (0,76 g kg<sup>-1</sup>) e obtiveram resultados promissores quando usados na dieta de *C. macropomum* para controlar e tratar infecções pelo endoparasito acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*. Tratamentos via ração podem apresentar melhor desempenho quando são utilizados contra endoparasitos, pois o óleo essencial possui ação direta contra o parasito. Em nosso estudo, não foi observado diferenças estatísticas nos índices parasitológicos nas diferentes concentrações do óleo essencial de *L. origanoides* na ração para o controle e tratamento do ectoparasito *Neobenedencia* sp. presentes em juvenis de tainha *M. liza*. No entanto, é importante destacar que a via de acesso do óleo essencial suplementando na ração pode impactar de forma indireta o parasito do peixe, uma vez que, essa via de acesso tende a modular a resposta imune do hospedeiro criando resistência, quando o tratamento se torna eficaz.

Um estudo realizado com baixas concentrações do óleo essencial de *L. origanoides* (20 mg L<sup>-1</sup> por 60 min, e 40 mg L<sup>-1</sup> por 30 min) por meio de banhos terapêuticos em alevinos de *Colossoma macropomum* teve um efeito anestésico nos peixes e as concentrações testadas não foram eficazes contra os parasitas monogenoides (*Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* e *Mymarothecium boegeri*), não sendo recomendado como tratamento contra os ectoparasitas nessa espécie (SOARES et al. 2017), Bandeira Junior et al. (2019) realizaram um estudo utilizando o óleo essencial de *Lippia origanoides* por meio de banhos terapêuticos em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), com sucesso terapêutico de 58,33% (5,0 µL L<sup>-1</sup>), melhorando a sobrevivência dos peixes infectados por *Aeromonas hydrophila*. Outro estudo relatou que juvenis de tambaquis (*Colossoma macropomum*) infectados experimentalmente com *A. hydrophila* tiveram alta taxa de sobrevivência em relação aos demais tratamentos (79,2%) após banho terapêutico com 10 mg L<sup>-1</sup> do óleo essencial de *L. origanoides* (OLIVEIRA et al. 2018). Um estudo realizado com *Lippia grata* por meio de banhos terapêuticos, indicou que 700 mg L<sup>-1</sup> é uma solução segura e efetiva para tratar *C. macropomum* infectado com

monogenoides *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis*, *Mymarothecium boegeri* e *Linguadactyloides brinkmanni* (Barriga et al. 2020).

#### 2.2.4.2 Variáveis hematológicas e glicose

Com relação aos parâmetros hematológicos, Oliveira et al. (2020) não observaram nenhuma alteração significativa nos níveis de Ht, Hb com o uso dos óleos essenciais das espécies de *L. grata* e *L. organoides* na dieta *Collossoma macropomum*, em comparação com o tratamento controle, para o tratamento de infecções causadas por *Neoechinorhynchus buttnerae*. Da mesma forma, os níveis médios de glicose plasmática não apresentaram diferença ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos com os três óleos essenciais das *Lippia grata*, *Lippia organoides* e *Ocimum gratissimum* e o grupo controle. No entanto, quando se comparou os tratamentos com diferentes concentrações, somente para *L. organoides* os níveis médios de glicose foram significativamente superior na maior concentração de óleo essencial. Em nosso estudo não foram observadas diferenças estatísticas entre as variáveis hematológicas e glicoses. Podemos observar que os dados apresentados indicam que os parâmetros estão dentro da faixa considerada "saudável" para essa espécie de peixe e não foram prejudicados pelos tratamentos.

#### 2.2.5. Conclusão

O óleo essencial de *Lippia organoides* suplementado na ração para juvenis de tainha *Mugil liza* não teve eficácia na eliminação do monogenoide *Neobenedenia* sp, em nenhuma das concentrações testadas. Entretanto, o uso do óleo não causou prejuízos ao desempenho zootécnico e aos indicadores hematológicos, podendo ser testado futuramente em relação a um potencial efeito imunomodulador e profilático.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado à C.S. Silva, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de Produtividade em Pesquisa à M.L. Martins (CNPq 306635/2018-6) e V.R. Cerqueira (CNPq309101/2017-4). Este estudo foi parcialmente financiado pela Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDEIRA, Guerino et al. Plant essential oils against bacteria isolated from fish: an in vitro screening and in vivo efficacy of *Lippia origanoides*. **Ciência Rural**, v.49, n.6, 2019.

<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20190064>

BRASIL. Instrução normativa interministerial nº 28, de 8 de junho de 2011. Estabelece normas técnicas para os sistemas orgânicos de produção aquícola a serem seguidos por toda pessoa física ou jurídica responsável por unidades de produção em conversão ou por sistemas orgânicos de produção. Disponível em:

[http://www.ibd.com.br/Media/arquivo\\_digital/e78177c8-62d5-4630-987d-d971d384a7e3.pdf](http://www.ibd.com.br/Media/arquivo_digital/e78177c8-62d5-4630-987d-d971d384a7e3.pdf)  
Acesso em: 25 jun. 2013.

BRISKIN, D. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant**, 2000.

CALSAMIGLIA, S., BUSQUET, M., CARDOZO, P. W., CASTILLEJOS, L., & FERRET, A. (2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2580–2595. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>

CERQUEIRA, Vinicius Ronzani et al. Manejo de reprodutores e controle da reprodução de peixes marinhos da costa brasileira. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 94-102, 2017.

CHAKRABORTY, S.B. e C. Hancz, Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture, Rev. **Aquaculture**, 2011.

CITARASU, T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. **Aquac. Int.**, (2010).

COSTA, Thaisa Sales et al. Effect of *Lippia grata* essential oil as a feed additive on the performance of tambatinga juveniles. **Acta Amazonica**, v. 52, p. 122-130, 2022.

<http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392202102442>

DURAND, J. D., SHEN, K. N., CHEN, W. J., JAMANDRE, B. W., BLEL, H., DIOP, K., NIRCHIO, M., GARCIA DE LEÓN, F. J., WHITFIELD, A. K., CHANG, C. W., & BORSA, P. (2012). Systematics of the grey mullets (Teleostei: Mugiliformes: Mugilidae): Molecular phylogenetic evidence challenges two centuries of morphology-based taxonomy. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 64(1), 73–92. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.03.006>

DURAND, J.D. et al. Systematics of the grey mullets (Teleostei: Mugiliformes: Mugilidae): molecular phylogenetic evidence challenges two centuries of morphology-based taxonomy. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 64, n. 1, p. 79-92, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.03.006>.

FONSECA NETO, J. C.; SPACH, Henry Louis. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 25, p. 13-17, 1999.

- LEMOS, V. M., VARELA, A. S., SCHWINGEL, P. R., MUELBERT, J. H., & VIEIRA, J. P. (2014). Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in south Brazil. **Journal of Fish Biology**, 85(3), 671–687. <https://doi.org/10.1111/jfb.12452>
- MENEZES, N. A. (2010). An old taxonomic dilemma: the identity of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). **Zootaxa**, 68(6), 59–68.
- MENEZES, Naercio A. et al. Taxonomic review of the species of Mugil (Teleostei: Perciformes: Mugilidae) from the Atlantic South Caribbean and South America, with integration of morphological, cytogenetic and molecular data. **Zootaxa**, v. 3918, n. 1, p. 1-38, 2015. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3918.1.1>.
- OLIVEIRA, S. R. N. et al. Toxicity of *Lippia origanoides* essential oil in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its effect against *Aeromonas hydrophila*. v.44, n.2, p.1-7, 2018. doi: 10.20950/1678-2305.2018.346
- PASCUAL, M. E. et al. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, 2001.
- RIBEIRO, Suzana Cardoso et al. Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrassalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Acta Amazonica**, v. 46, p. 99-106, 2016.
- SAMPAIO, Luís André Nassr de; FERREIRA, Ana Helena Ferreira; TESSER, Marcelo Borges. Effect of stocking density on laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Günther, 1880). **Acta Scientiarum**, v.23, n.2, p.471-475, 2001.
- SICCHA-RAMIREZ, Raquel et al. Molecular identification of mullet species of the Atlantic South Caribbean and South America and the phylogeographic analysis of *Mugil liza*. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 22, n. 1, p. 86-96, 2014. <https://doi.org/10.1080/10641262.2013.833583>.
- SOARES, B. V. e TAVARES-DIAS, M. Espécies de Lippia (Verbenaceae), seu potencial biativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônica**. v. 3, pg. 109-123, 2013.
- SOARES, B. V., NEVES, L. R., OLIVEIRA, M. S. B., CHAVES, F. C. M., DIAS, M. K. R., CHAGAS, E. C., & TAVARES-DIAS, M. (2016). Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. **Aquaculture**, 452, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.029>
- SOARES, Bruna Viana et al. Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, v. 469, p. 72-78, 2017.
- TAVARES-DIAS, M. (2018). Current knowledge on use of essential oils as alternative treatment against fish parasites. **Aquatic Living Resources**, 31(13), 4–7. <https://doi.org/10.1051/alr/2018001>

VALLEJOS-VIDAL, E. et al. The response of fish to immunostimulant diets. **Fish & Shellfish Immunology**, 2016.

WANG, J. L. X-l Meng, R-h Lu, C. Wu, Y.-T. Luo, X. Yan, et al., Effects of *Rehmannia glutinosa* on growth performance, immunological parameters and disease resistance to *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Aquaculture*, 2015.

### 3 CONCLUSÕES GERAIS

Com exceção do óleo essencial de *Lippia alba*, todos os demais óleos, quimioterápicos e o tratamento com água doce causaram a mortalidade *in vitro* de *Neobenedenia* sp. Dentre os óleos essenciais a *Lippia organoides* apresentou o melhor resultado contra o *Monogenea* na concentração 600 mg L<sup>-1</sup>. O peróxido de hidrogênio apresentou a maior eficiência contra o parasito na concentração 350 mg L<sup>-1</sup> e a água doce também se mostrou eficiente.

O óleo essencial de *Lippia organoides* suplementado na ração para juvenis de tainha *Mugil liza* não teve eficácia na eliminação do monogenea *Neobenedenia* sp, em nenhuma das concentrações testadas. No entanto, a utilização do óleo na ração não afetou de forma negativa as variáveis hematológicas, podendo ser testada futuramente em relação a um potencial efeito imunomodulador e profilático.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABDALLAH, Vanessa D.; DE AZEVEDO, Rodney K.; LUQUE, José L. Four new species of *Ligophorus* (Monogenea: Dactylogyridae) parasitic on *Mugil liza* (Actinopterygii: Mugilidae) from Guandu River, Southeastern Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 4, p. 855-864, 2009.

ALBIERI, Rafael J.; ARAÚJO, Francisco G. Reproductive biology of the mullet *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in a tropical Brazilian bay. **Zoologia (Curitiba)**, v. 27, n. 3, p. 331-340, 2010.

Andrade-Porto, S. M et al. Histopathological evaluation of formalin toxicity in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from Amazon. **Pesq. Vet. Brasil**. (In press), 2017.

ANDREATTA, E. R.; ROCHA, IP de; RODRIGUES, J. B. R. Ensaio sobre desova induzida da tainha, *Mugil brasiliensis* Spix et Agassiz (1831). In: **Anais do II Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca**. 1981. p. 463-468.

AVENDAÑO-HERRERA, R.; MAGARIÑOS, M.; MAGARIÑOS, R.; TORANZO, A. E. Use of hydrogen peroxide against the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* and its effect on infected turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture**, 257: 104-110, 2006.

BATISTA, Erix Santos et al. *Lippia alba* essential oil as anesthetic for tambaqui. **Aquaculture**, v. 495, p. 545-549, 2018.

BENETTI, Daniel D.; NETTO, Eduardo B. Fagundes. **Considerações sobre desova e alevinagem a tainha (*Mugil liza*, Valenciennes, 1836) em laboratório**. Instituto de Pesquisas da Marinha, Ministério da Marinha, 1980.

BETONI, Joyce Elaine Cristina et al. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 387-390, 2006.

CARVALHO, Cristina V. A. et al. The effect of protein levels on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil platanus* (Günther). **Aquaculture research**, v. 41, n. 4, p. 511-518, 2010.

CARVALHO, Cristina Vaz Avelar et al. Maturation, spawning and larviculture of the mullet *Mugil liza* under laboratory conditions. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 1, p. 31-36, 2019.

CERQUEIRA, Vinicius Ranzoni et al. Broodstock management and control of reproduction in marine fishes of the Brazilian coast. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 94-102, 2017.

CITTI, Andre Lee et al. Ascocotyle (Phagicol) longa parasitando tainhas (*Mugil liza*, Valenciennes, 1836) em São Paulo: ocorrência, importância na saúde pública e estratégias de controle. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 3, p. 36-43, 2014.

- CORRÊA, C.B.V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt., Wilson - erva-cidreira. **Revista Brasileira de Farmacologia**, Rio de Janeiro, v.73, n.3, p.57 – 64, 1992
- CUNHA, Mauro Alves 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.
- DESCHAMPS, Cícero *et al.* Avaliação de genótipos de *Mentha arvensis*, *Mentha x piperita* e *Mentha* spp. para a produção de mentol. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 178-183, 2013.
- DURAND, J. D. et al. Systematics of the grey mullets (Teleostei: Mugiliformes: Mugilidae): molecular phylogenetic evidence challenges two centuries of morphology-based taxonomy. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 64, n. 1, p. 79-92, 2012.
- FAO. Food and agriculture organization of the united nations. Relatório sobre o estado Mundial da pesca e aquicultura (Sophia). 2022
- FERREIRA, Daiane; BARCELLOS, Leonardo José G. I. L. Enfoque combinado entre as boas práticas de manejo e as medidas mitigadoras de estresse na piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 4, p. 601-611, 2008.
- FONSECA NETO, J. C.; SPACH, Henry Louis. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Gunther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 25, p. 13-17, 1999.
- FRANCIS-FLOIR, KLINGER R. Use of potassium permanganate to control external infections of ornamental fish. Fact sheet FA-37. Miami: Institute of Food and Agricultural Sciences, 1–3, 2003.
- FREITAS SOUZA, Carine et al. Citral and linalool chemotypes of *Lippia alba* essential oil as anesthetics for fish: a detailed physiological analysis of side effects during anesthetic recovery in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 21-34, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0410-z>.
- GARBIN, Thaís; CASTELLO, Jorge Pablo; KINAS, Paul Gerhard. Age, growth, and mortality of the mullet *Mugil liza* in Brazil's southern and southeastern coastal regions. **Fisheries Research**, v. 149, p. 61-68, 2014.
- GARLET, Tânea Maria Bisognin *et al.* Produção e qualidade do óleo essencial de menta em hidroponia com doses de potássio. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4 p. 956-962, 2007.
- GODINHO, Heloisa Maria et al. Induced spawning of the mullet *Mugil platanus* GUNTHER, 1880, in Cananéia, São Paulo, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.20, p. 59-66, 1993.
- GONZÁLEZ-CASTRO, Mariano; MACCHI, Gustavo Javier; COUSSEAU, María Berta. Studies on reproduction of the mullet *Mugil platanus* Gunther, 1880 (Actinopterygii, Mugilidae) from the Mar Chiquita coastal lagoon, Argentina: similarities and differences with related species. **Italian Journal of Zoology**, v. 78, n. 3, p. 343-353, 2011.
- GUERETZ, Juliano Santos et al. Estudo da prevalência de *Ascocotyle* (Phagicola) longa em mugilídeos capturados na Baía da Babitonga, Santa Catarina, Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v. 24, n. 3, 2019.

HARLEY, Raymond Mervyn. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia**, v. 63, p. 129-144, 2012.

HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., JOSEPH, H., BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116 p.211-222, 2008.

HIRAZAWA, N. et al. Susceptibility of spotted halibut *Verasper variegatus* (Pleuronectidae) to infection by the Monogenean *Neobenedeniagirellae* (Capsalidae) and oral therapy trials using praziquantel. **Aquaculture** n. 238, 83–95. 2004.

HOWE, G. E.; GINGERRICH, W. H.; DAWSON, V. K.; OLSON, J. J. Efficacy of hydrogen peroxide for treating saprolegniasis in channel catfish. **J. Aqua. Animal Health**, p. 222-230, 1999.

HUTSON, K. S.; ERNST, I.; WHITTINGTON, I. D. Risk assessment for metazoan parasites of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae) in South Australian sea-cage aquaculture. **Aquaculture**, n. 271, p. 85-99, 2007.

ISCAN, Gokalp et al. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, p. 3943-3946, 2002.

JUNG, S. H.; SIM, D. S.; MI-SEON PARK, M. S.; JO, K.; YOON KIM, Y. Effects of formalin on haematological and blood chemistry in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). **Aquaculture Research**, n. 34, p. 1269- 1275, 2003.

KAZUKO, I. T. O.; BARBOSA, José Carlos. Nível protéico e proporção de proteína de origem animal em dietas artificiais para a tainha, *Mugil platanus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 24, n. único, p. 111-117, 1997.

KODAMA H, MATSUOKA Y, TANAKA Y, et al. Changes of C-reactive protein levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sera after exposure to anti-ectoparasitic chemicals used in aquaculture. **Fish Shellfish Immunol**, n. 16, p. 589–597, 2004.

LEIRA, Matheus Hernandez et al. Problemas sanitários das pisciculturas brasileiras. **Pubvet**, v. 11, p. 538-645, 2017.

LEMOS, Valéria Marques et al. Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in south Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 85, n. 3, p. 671-687, 2014.

LORENZI, H. MATOS; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum**, 2. ed, p. 544, 2008.

MAJOLO, Cláudia et al. Antimicrobial activity of some essential oils against *Streptococcus agalactiae*, an important pathogen for fish farming in Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 30, n. 5, p. 388-397, 2018.

MAJOLO, Claudia 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.

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

MENEZES, Naercio A.; OLIVEIRA, C. de; NIRCHIO, Mauro. An old taxonomic dilemma: the identity of the western South Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). **Zootaxa**, v. 2519, n. 1, p. 59-68, 2010.

MIRANDA-FILHO, K. C. et al. TAINHA. IN: BALDISSEROTO, Bernardo. e GOMES, Levy de Carvalho. (org.). **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. UFSM, Santa Maria, p. 541-552, 2010.

MPA/MMA. Plano de Gestão para o uso sustentável da tainha, *Mugil liza* Valenciennes, 1836, no Sudeste e Sul do Brasil. **Ministério da Pesca e Aquicultura/Ministério do Meio Ambiente**. 2015.

NOVAES SIMÕES, Larissa et al. Essential oil of *Lippia alba* as a sedative and anesthetic for the sea urchin *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758). **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 50, n. 3, p. 205-217, 2017.  
<https://doi.org/10.1080/10236244.2017.1362317>.

OGAWA, K et al. *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection of cultured cobia *Rachycentron canadum* in Taiwan. **Fish Pathol.** n. 33, p. 303–309. 2006.

OKAMOTO, Marcelo Hideo; DE SAMPAIO, Luís André Nassr; DE PINHO MAÇADA, Armindo. Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Gunther, 1880. **Atlântica (Rio Grande)**, v. 28, n. 1, p. 61-66, 2006.

OLIVEIRA, A. R. M. F. Produção de óleo essencial de *Mentha piperita* var. citrata sob diferentes condições de manejo. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrônômica) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2011.

PASSINI, G. et al. Reprodução e larvicultura da tainha *Mugil liza* no Estado de Santa Catarina. In: Feira Nacional do Camarão, 12, **Latin American and Caribbean Aquaculture**, 2015, Fortaleza. Abstract Book. Fortaleza: ABCC, 2015. p.410. Resumo.

RACH J. J.; HOWE, G.; SCHREIRER T. M. Safety of formalin treatments on warm- and cool-water fish eggs. **Aquaculture**, n. 149, p. 183–191, 1997.

RACH, J. J.; GAIKOWSKIA, M.; PRAMSAY. Efficacy of hydrogen peroxide to control parasitic infestations on hatchery-reared fish. **J. Aquat. Anim. Health.**, n. 12, p. 267-273, 2000.

SACCOL, E. M. H. Adição do óleo essencial de *Lippia alba* (MILL) N.E. BROWN na dieta do jundiá: análise do crescimento e da resposta antioxidante. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), p. 63. 2013.

SACCOL, Etiane MH *et al.* Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. **Aquaculture**, v. 416-417, p. 244-254, 2013.

SALBEGO, J. et al. Biochemical parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transport with eugenol or essential oil of *Lippia alba* added to the water. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, p. 696-702, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.16515>.

SAMPAIO, L. A.; WASIELESKY, W.; MIRANDA-FILHO, K. Campos. Effect of Salinity on Acute Toxicity of Ammonia and Nitrite to juvenile *Mugil platanus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, p. 668-674, 2002.

SAMPAIO, Luís André Nassr de; FERREIRA, Ana Helena Ferreira; TESSER, Marcelo Borges. Effect of stocking density on laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Gunther, 1880). 2001. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 471-475, 2001.

SANTOS, Vera Maria Carvalho Silva *et al.* Seasonal variation of vegetative growth, essential oil yield and composition of menthol mint genotypes at southern Brazil. **Embrapa Agroindústria de Alimentos-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, v. 28, 2012.

SITJÀ-BOBADILLA, A.; FELIPE, M. C.; ALVAREZ-PELLITERO, P. *In vivo* and *in vitro* treatments against *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, p. 856–864. 2006.

SOUZA, Carine de Freitas *et al.* *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), submitted to a stressful condition: effect of dietary addition of the essential oil of *Lippia alba* on metabolism, osmoregulation and endocrinology. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, p. 707-714, 2015.

SOUZA, Renilde Cordeiro *et al.* Dietary addition of the essential oil from *Lippia alba* to Nile tilapia and its effect after inoculation with *Aeromonas* spp. **Aquaculture Nutrition**, p. 1-7, 2018. <https://doi.org/10.1111/anu.12827>.

STANISAVLJEVIĆ, Dragana *et al.* Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oils obtained from *Mentha longifolia* L. Hudson, dried by three different techniques. **Records of Natural Products**, v. 8, n. 1, p. 61-65, 2014.

SUTILI, Fernando 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, p. 95-100, 2015.

TAMPIERI, Maria Paola *et al.* The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathologia**, v. 159, n. 3, p. 339-345, 2005.

THOMAS-JINU, S.; GOODWIN, A. E. Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinnesque): efficacy of practical treatments for warm water aquaculture ponds. *J. Fish Dis.*, 27:23-28,

VIDAL, F. *et al.* *Giardia lamblia*: the effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. **Experimental parasitology**, v. 115, n. 1, p. 25-31, 2007.

VIEIRA, J. P.; SCALABRIN, C. Migração reprodutiva da “tainha” (*Mugil platanus* Gunther, 1980) no sul do Brasil. **Atlântica**, v. 13, n. 1, p. 131-141, 1991.

Whittington I. The Capsalidae (Monogenea: Monopisthocotylea): a review of diversity, classification and phylogeny with a note about species complexes. **Folia Parasit**, n. 51, p. 109–122. 2004.

WHITTINGTON, I. D. *Benedenia seriolae* and *Neobenedenia* species. In: Woo PTK, Buchmann K (eds) Fish parasites: pathobiology and protection. **CABO publishing**, Oxford, p. 225–244. 2012.

YADEGARINIA, Davod et al. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita L.* and *Myrtus communis L.* essential oils. **Phytochemistry**, v. 67, n. 12, p. 1249-1255, 2006.

YAMANAKA, N. *et al.* Larvicultura e observações sobre o crescimento da tainha *Mugil sp.* em cativeiro (Cananéia, SP). In: Encontro Nacional de Aquicultura - VII SIMBRAQ e II ABRAPOA, Anais. **Acadêmia de Ciências do Espírito Santo**. p. 22-26. 1992.

## APÊNDICE

Apêndice 1. Composição química do óleo essencial de *Lippia sidoides*.

<b>Pico</b>	<b>Componentes</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>IR*</b>
1	( <i>E</i> )-2-hexenal	0.5	853
2	alfa-tujeno	1.2	928
3	alfa-pineno	0.5	936
4	1-octen-3-ol	0.6	977
5	Mirceno	2.4	989
6	alfa-terpineno	1.1	1016
7	p-cimeno	13.3	1025
8	1,8-cineol	0.9	1032
9	gama-terpineno	4.5	1059
10	Linalol	2.8	1096
11	Ipsdienol	0.4	1144
12	Umbelulona	1.1	1175
13	timil-metil-éter	0.9	1232
14	Timol	9.9	1288
15	Carvacrol	49.7	1298
16	acetato de carvacrila	0.4	1369
17	( <i>E</i> )-beta-cariofileno	1.5	1414
18	n.i.	0.0	1487
19	n.i.	0.0	1566
20	óxido de cariofileno	1.0	1576
<b>Total de compostos identificado</b>		<b>92.90</b>	

; \*Índice de retenção  
n.i: Não identificado

Apêndice 2. Composição química do óleo essencial de *Lippia sidoides*.

Pico	Componentes	Teor (%)	RI*
1	$\alpha$ -tujeno	0.8	925
2	$\alpha$ -pineno	0.3	931
3	$\beta$ -pineno	0.1	975
4	Mirceno	1.5	989
5	$\alpha$ -felandreno	0.1	1004
6	$\delta$ -3-careno	0.1	1009
7	$\alpha$ -terpineno	1.0	1015
8	n.i.	0.1	1016
9	p-cimeno	7.3	1023
10	Limoneno	0.5	1026
11	1,8-cineol	0.3	1029
12	(Z)- $\beta$ -ocimeno	0.1	1034
13	(E)- $\beta$ -ocimeno	0.1	1045
14	$\gamma$ -terpineno	3.0	1056
15	terpinoleno	n.d.	1087
16	p-cimeno	n.d.	1088
17	Linalol	0.1	1099
18	n.i.	0.4	1101
19	ipsdienol	0.3	1144
20	terpinen-4-ol	0.6	1175
21	n.i.	0.2	1176
22	timol-metil eter	0.6	1233
23	Timol	75.4	1298
24	carvacrol	0.3	1303
25	$\alpha$ -copaeno	0.3	1373
26	(E)-cariofileno	4.3	1417
27	trans- $\alpha$ -bergamoteno	n.d.	1433
28	aromadendreno	0.4	1436
29	$\alpha$ -humuleno	0.2	1450
30	allo-aromadendreno	n.d.	1457
31	n.i.	n.d.	1486
32	biciclogermacreno	n.d.	1492
33	$\alpha$ -muuroleno	0.4	1497
34	$\beta$ -bisaboleno	0.1	1506
35	$\delta$ -cadineno	0.2	1521
36	espatulenol	0.1	1575
37	óxido de cariofileno	0.6	1580
<b>Total de compostos identificado</b>		<b>99.28</b>	

\*Índice de retenção

n.i: Não identificado

nd: Não detectado



Apêndice 3. Composição química do óleo essencial de *Lippia alba*.

<b>Pico</b>	<b>Componentes</b>	<b>Teor %</b>	<b>IR*</b>
1	beta-pineno	0.7	977
2	Mirceno	3.5	989
3	Limoneno	17.5	1029
4	(Z)-ocimeno	0.3	1037
5	(E)-ocimeno	1.1	1048
6	Linalol	1.6	1096
7	trans-di-hidro-carvona	0.2	1200
8	trans-carveol	0.4	1216
9	Carvona	61.7	1245
10	Piperitona	0.6	1252
11	Piperitenona	0.7	1337
12	alfa-copaeno	0.5	1372
13	beta-bourboneno	0.4	1380
14	beta-elemeno	0.3	1387
15	(E)-beta-cariofileno	1.8	1414
16	alfa-humuleno	0.2	1456
17	germacreno D	2.7	1475
18	alfa-muuroleno	0.2	1497
19	germacreno A	0.5	1508
20	gama-cadineno	0.4	1517
21	Nerolidol	0.4	1557
22	óxido de cariofileno	0.3	1576
23	beta-cedren-9-ona	0.8	1641
24	n.i.	0.0	1655
25	n.i.	0.0	1677
<b>Total de compostos identificado</b>		<b>96,7</b>	

\*Índice de Retenção

n.i: Não identificado

Apêndice 4. Composição química do óleo essencial de *Mentha piperita*.

	<b>Componentes</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>IR*</b>
1	n.i.	0.19	843
2	$\alpha$ -pineno	0.29	930
3	$\beta$ -pineno	0.63	973
4	mirceno	0.37	988
5	p-cimeno	0.26	1022
6	limoneno	3.16	1025
7	1,8-cineol	1.64	1027
8	mentona	12.93	1151
9	mentofurano	1.47	1160
10	neo-mentol	2.42	1163
11	mentol	30.52	1175
12	neo-isomentol	1.04	1190
13	n.i.	0.45	1213
14	pulegona	14.21	1237
15	n.i.	0.34	1247
16	piperitona	1.52	1250
17	acetato de neo-mentila	0.82	1271
18	acetato de mentila	14.56	1292
19	n.i.	0.69	1342
20	n.i.	1.11	1345
21	(E)-cariofileno	0.25	1410
22	n.i.	0.31	1488
23	mentalactona*	5.34	1495
24	n.i.	0.47	1523
25	óxido de cariofileno	0.39	1572
26	viridiflorol	2.02	1584
27	n.i.	0.81	2258
28	n.i.	0.28	2263
29	n.i.	1.16	2306
30	n.i.	0.30	2434
<b>Total de compostos identificados</b>		<b>99.95</b>	

\*Índice de Retenção

n.i: Não identificado